

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 4 月 18 日 (18.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/31163 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/57, 9/64, 5/00, 1/19, 1/21,  
1/15, C07K 16/40, C12Q 1/68, G01N 33/50

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08913

(22) 国際出願日: 2001 年 10 月 11 日 (11.10.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2000-311309 2000 年 10 月 11 日 (11.10.2000) JP  
特願 2001-102905 2001 年 4 月 2 日 (02.04.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人  
かずさディー・エヌ・エー研究所 (KAZUSA DNA  
RESEARCH INSTITUTE FOUNDATION) [JP/JP]; 〒  
292-0812 千葉県木更津市矢那1532番3号 Chiba (JP). 三  
菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA  
CORPORATION) [JP/JP]; 〒541-0046 大阪府大阪市  
中央区平野町二丁目6番9号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小原 収  
(OHARA, Osamu) [JP/JP]. 長瀬 隆弘 (NAGASE,  
Takahiro) [JP/JP]. 野村 信夫 (NOMURA, Nobuo)  
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番3号 財  
団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所内 Chiba  
(JP). 矢野和宏 (YANO, Kazuhiro) [JP/JP]. 村上弘次

(MURAKAMI, Kohji) [JP/JP]. 保田 慎一郎 (YASUDA,  
Shin-ichiro) [JP/JP]. 神さき 康治 (KANZAKI, Koji)  
[JP/JP]; 〒103-8405 東京都中央区日本橋本町二丁目  
2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内  
Tokyo (JP).

(74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒101-0032 東京  
都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル6階  
Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL ADAMTS FAMILY POLYPEPTIDE AND GENE ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規な ADAMTS ファミリーポリペプチドおよびそれをコードする遺伝子

(57) Abstract: By isolating a cDNA encoding a novel protein originating in human brain, a novel ADAMTS family protein, which is found out as belonging to the ADAMTS family based on the analysis of its homology with known sequences and in which a reprolysin-type ZN-metalloprotease domain, a disintegrin-like domain and a TSP1 (thrombospondin type 1) domain are conserved, is obtained. This protein is characterized by high-expression in ovaries, changes in expression dose depending on the sexual cycle, a decrease in content in tumor cells and location of the gene on the 5P-syndrome deletion site on chromosome. By taking advantage of these characteristics, the above-described cDNA; the above-described protein and a polypeptide or a peptide derived therefrom; an antibody against the protein; a method of screening an inhibitor, an antagonist or a promoter of the effect of the protein; compounds thus screened; etc. are provided. Moreover, medicinal compositions and diagnostic and therapeutic methods with the use of the same are provided.

[続葉有]

WO 02/31163 A1



---

(57) 要約:

ヒト脳由来の新規なタンパク質をコードするcDNAを単離し、公知配列との相同性分析からADAMTSファミリーに属し、レプロリシン (reprolysin) 型亜鉛メタロプロテアーゼドメイン (Zn-metalloprotease)、ディスインテグリン様 (disintegrin-like) ドメイン及びTSP1 (thrombospondin type 1) ドメインを保存している新規なADAMTSファミリータンパク質を得た。特性は、卵巣での高発現及び性周期における発現量の変動、腫瘍細胞における存在の低下及び当該遺伝子の染色体上の位置が5P-症候群の欠失部位に位置することを特徴とする。この特性を利用して、該cDNA、該タンパク質及びその由来物であるポリペプチドもしくはペプチド、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質の有する作用の阻害剤・拮抗剤・賦活剤のスクリーニング方法、スクリーニングされた化合物等を提供し、これらを利用した医薬組成物、診断・治療方法を提供する。

## 明 細 書

新規なADAMTSファミリーポリペプチドおよびそれをコードする遺伝子

## 5 技術分野

本発明は、新規なADAMTSファミリーポリペプチド又はタンパク質、及び該ポリペプチド又はタンパク質をコードするポリヌクレオチドに関するものである。さらに詳しくは、該ポリペプチド若しくはタンパク質のアミノ酸配列の全部若しくは一部を有するペプチド、該ペプチド又はポリペプチドをコードするポリ  
10 ヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該ペプチド又はポリペプチドに対する抗体、これらを利用した化合物のスクリーニング方法でスクリーニングされた化合物、該ポリペプチド若しくは該ポリヌクレオチドに作用する活性阻害化合物又は活性賦  
15 当該形質転換体を使ったペプチド又はポリペプチドの製造方法、当該スクリーニング方法に関する。

## 背景技術

近年、レプロリシン型 (reprolysin type) 亜鉛メタロプロテ  
20 アーゼドメイン (Zn-metalloprotease) (Hooper N. M. FEBS Lett. (1994) 354: 1-6)、ディスインテグリン様 (disintegrin-like) ドメイン及びTSP1 (thrombospondin type 1 repeats) ドメインを有するユニークなタンパク質が見い出されており (Kuno K., et al., J. Bio  
25 l. Chem. (1997) 272: 556-562; Vazques. F., et al, J. Biol. Chem. (1999) 274: 23349-23357等)、これらの特徴的なドメインを有するタンパク質はADAMTS (a

disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs)ファミリーと総称されている(Tang B. L., et al., FEBS Lett. (1999) 445:223-225)。

- 5    レプロリシン型亜鉛メタロプロテアーゼドメインは、ADAMTS及びADAM (a disintegrin and metalloprotease) ファミリー等に含まれ、活性中心は一般にHEX1X2HXX1GX1XHD(通常、X1;疎水性アミノ酸、X2;グリシンあるいは疎水性アミノ酸)であり、3つのヒスチジン残基が1つの亜鉛分子に配位していると考えられている(Hooper N. M. FEBS Lett. (1994) 354:1-6)。

- 10    TSP1ドメインは、トロンボスポンジン1 (thrombospondin-1) が有する繰り返し配列として見い出され、そのCSVTCGモチーフはCD36/LIMP II受容体に結合し、WSXWモチーフは細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan) に結合することが知られている。

15    ディスインテグリン様ドメインは、システインに富み抗血液凝固作用を有するヘビ毒のディスインテグリン (disintegrin) に40%程度の相同性を有している。機能的にヘビ毒のディスインテグリンと同等あるいは同様の作用を有するかは未解明である。

- 20    現在、ADAMTSファミリーとしてADAMTS-1~10、12~13の12種類 (ADAMTS11も報告されているが、ADAMTS5と同一分子であった) が報告されている。その中には、細胞外マトリックスのアグリカン (Aggrecan) 切断活性を持つADAMTS-4 (Aggrecanase-1)、ADAMTS-5 (Aggrecanase-2) やプロコラーゲン切  
25    断活性をもつADAMTS-2 (procollagen I/II amino peptidase) のように従来のマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloprotease) とよく似た酵素活性をもつ

ものが認められている反面、ADAMTS-1 (METH1) やADAMTS-8 (METH2) のようにエンドスタチン (endostatin) やTSPという従来知られていた血管新生阻害因子よりも強い血管新生阻害作用を持つものも発見されている (Vazques. F., et al., J. Biol. Chem. (1999) 274:23349-23357)。

ADAMTS-1については、血管新生阻害作用の他、炎症組織での発現上昇 (Kuno K., et al., J. Biol. Chem. (1997) 272:556-562)、性周期による発現変動と排卵への関与 (Robker R. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2000) 97:4689-4694; Robker R. L., et al., Steroids (2000) 65:559-570) 等が報告されている。基質としては、アグリカン (Kuno K., et al., FEBS Lett. (2000) 478:241-245) 及びバージカン (Versican) (Sandy J. D., et al., J. Biol. Chem. (2001) 276:13372-13378) が報告されている。

ADAMTS-2は、その欠損が、プロコラーゲンIの蓄積による皮膚の形成異常を特徴とするEhlers-Danlos syndrome type VII Cの原因であることが報告されている (Colige A., et al., Am. J. Hum. Genet. (1999) 65:308-317; Li S. W., et al., Biochem. J. (2001) 355:271-278)。

ADAMTS-3は、ドメイン構造及び活性中心の配列がADAMTS-2と非常に似ており、ADAMTS-2とともにプロコラーゲンIIを基質とすることが報告されている (Fernandes R. J., et al., J. Biol. Chem. (2001) 276:31502-31509)。

ADAMTS-4及びADAMTS-5は、基質としてアグリカンの373番目のグルタミン酸残基と374番目のアラニン残基間 (Glu373-Ala374 bond) を切断することが報告されている (Tortorella M.

D., et al., Science (1999) 284:1664-1666; Abbaszade I., et al., J. Biol. Chem. (1999) 274:23443-23450)。同部位の切断は慢性関節リウマチや変形性関節症のような関節軟骨破壊を伴う関節疾患の初期徴候の一つであり (Sandy J. D., J. Clin. Invest. (1992) 89:1512-1516)、ADAMTS-4及びADAMTS-5の阻害剤がその治療薬として着目されている。また、生体内におけるADAMTS-4及びADAMTS-5の強力な阻害剤としてTIMP-3が報告されている (Hashimoto G., et al., FEBS Lett. (2001) 494:192-195; Kashiwagi M., et al., J. Biol. Chem. (2001) 276:12501-12504)。ADAMTS-4については、アグリカン以外の基質として、プレビカン (brevican) (Matthews R. T., et al., J. Biol. Chem. (2000) 275:22695-22703)、バージカン (Sandy J. D., et al., J. Biol. Chem. (2001) 276:13372-13378) が報告されている。

最近同定されたADAMTS-13については、血液凝固に関与するフォンビルブランドファクター (von Willebrand factor) の切断活性が認められている (Fujikawa K., et al., Blood (2001) 98:1662-1666; Zheng X., et al., J. Biol. Chem. (2001) Sep13 [epub ahead of print]; Soejima K., et al., J. Biochem. (Tokyo) (2001) 130:475-480)。同酵素活性の欠損は、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura) の原因とされており、ADAMTS-13が着目されている。

25

#### 発明の開示

本発明が解決しようとする課題のひとつは、上記のように多様な作用の原因物

- 質となり得るADAMTSファミリータンパク質に関する新規な物質を見出し、生体内におけるADAMTSファミリータンパク質の制御を可能にすることである。より具体的には、本発明の課題は新規な特性をもつ新規なADAMTSファミリータンパク質を提供することであり、それに伴い有用性ある新規なADAMTSファミリータンパク質由来のペプチド又はポリペプチドを提供することである。また本発明の別の課題は、新規なADAMTSファミリータンパク質由来のペプチド又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することであり、さらにこれを利用して遺伝子工学手法による新規なADAMTSファミリータンパク質の製造法を提供することである。さらに本発明の別の課題は、新規なADAMTSファミリータンパク質、ペプチド又はポリペプチドに対する抗体を提供することである。その他の本発明の課題は、上記のものを利用して新規なADAMTSファミリータンパク質の有する作用の阻害剤・拮抗剤・賦活剤のスクリーニングを行なうことであり、スクリーニングされた化合物を提供することであり、またこれらを利用した医薬組成物及び診断方法を提供することである。
- 15 本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト脳細胞中のmRNA由来のcDNAライブラリーから新規なADAMTSファミリータンパク質をコードするcDNAを単離し、全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、当該タンパク質はN末端側にレプロリシン (reprolysin) 様の亜鉛メタロプロテアーゼドメイン (Zn-metalloprotease) を1個、C末端側にTSP1ドメインを5回繰り返して保持し、その中間にディスインテグリン様ドメインを1個有することを確認し、これらのcDNAにコードされるタンパク質が新規なADAMTSタンパク質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。
- 25 すなわち、本発明の1態様は、下記の群より選ばれるADAMTSファミリーに属するポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質である；
- ①配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列から

なるポリペプチド、

②前記①のポリペプチドを含有するポリペプチド、

③前記①のポリペプチドと少なくとも約50%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、

5 及び

④前記①～③のポリペプチドにおいて、そのアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するポリペプチド。

本発明の1態様は、配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列の一部を有する部分ペプチドであって、少なくとも約8個の連続するアミノ酸配列を有するペプチドである。

本発明の1態様は、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその相補鎖である。

本発明の1態様は、配列表の配列番号2又は配列番号3又は配列番号7に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド又はその相補鎖である。

15 本発明の1態様は、上記ポリヌクレオチド又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドである。

本発明の1態様は、上記ペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその相補鎖である。

20 本発明の1態様は、配列表の配列番号2又は配列番号3又は配列番号7に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド又はその相補的塩基配列の少なくとも約15個の連続する塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

本発明の1態様は、上記ポリヌクレオチド又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドである。

25 本発明の1態様は、上記いずれか1つのポリヌクレオチド又はその相補鎖を含有する組換えベクターである。

本発明の1態様は、上記組換えベクターで形質転換された形質転換体である。

本発明の1態様は、上記形質転換体を培養する工程を含む、上記ポリペプチド

若しくは該ポリペプチドを有するタンパク質又はペプチドの製造方法である。

本発明の1態様は、上記ポリペプチド若しくは該ポリペプチドを有するタンパク質又はペプチドを免疫学的に認識する抗体である。

5 本発明の1態様は、少なくともADAMTSファミリーポリペプチドを認識する、上記抗体である。

10 本発明の1態様は、上記ポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質と相互作用してその活性を阻害若しくは促進する作用を有する化合物、及び／又は上記いずれかのポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害若しくは促進する作用を有する化合物のスクリーニング方法であって、上記ポリペプチド若しくは該ポリペプチドを有するタンパク質又はペプチド、上記いずれかのポリヌクレオチド、上記ベクター、上記形質転換体、上記抗体のうちの少なくともいずれか一つを用いることを特徴とするスクリーニング方法である。

15 本発明の1態様は、上記ポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質と相互作用してその活性を阻害若しくは活性化する化合物、又は上記いずれかのポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害若しくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、化合物とポリペプチド又はタンパク質との間の相互作用を可能にする条件下で、ポリペプチド又はタンパク質とスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる相互作用はポリペプチド又はタンパク質と化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである）、次いで、化合物とポリペプチド又はタンパク質との相互作用により生じるシグナルの存在又は不存在又は変化を検出することにより、化合物がポリペプチド又はタンパク質と相互作用して、その活性を活性化又は阻害するかどうかを決定することを含む方法である。

25 本発明の1態様は、上記方法でスクリーニングされる化合物であって、上記ポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質と相互作用してその活性を阻害又は促進する化合物又はその塩である。

本発明の1態様は、上記方法でスクリーニングされる化合物であって、上記い

ずれかのポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害若しくは促進する化合物又はその塩である。

本発明の1態様は、上記ポリペプチド若しくは該ポリペプチドを有するタンパク質又はペプチド、上記いずれかのポリヌクレオチド、上記ベクター、上記形質  
5 転換体、上記抗体、又は上記化合物のうちの少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする医薬組成物である。

本発明の1態様は、上記ポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質の発現又は活性に関連した疾病の診断方法であって、(a)該ポリペプチド又はタンパク質をコードしている核酸、及び／又は(b)個体由来の試料中の該ポリペ  
10 プチド又はタンパク質をマーカーとして分析することを含む方法である。

本発明の1態様は、上記ポリペプチド若しくは該ポリペプチドを有するタンパク質又はペプチド、上記いずれか1つのポリヌクレオチド、又は上記抗体のうちの少なくともいずれか1つを含んでなる、(a)該ポリペプチド又はタンパク質をコードしている核酸、及び／又は(b)試料中の該ポリペプチド又はタンパク質  
15 をマーカーとして分析することを含む方法に使用する試薬キットである。

本発明の1態様は、上記ポリヌクレオチド又はその相補鎖をエクソンとして含有するヒトゲノム遺伝子断片たるポリヌクレオチドである。

本発明の1態様は、上記ヒトゲノム遺伝子断片の塩基配列又はその相補配列の少なくとも15個の連続する塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

20 本発明の1態様は、上記ポリヌクレオチド又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドである。

本発明の1態様は、上記ポリヌクレオチド又はその相補鎖をマーカー又はプライマーとして用いることを特徴とする疾病の診断方法である。

## 25 図面の簡単な説明

図1はヒトPJ01256を有するベクターpCMH01-PJ01256を示す模式図である。

図2はヒトPJ01256を有するベクターを形質導入した哺乳動物細胞でのヒトPJ01256タンパク質の発現を示す。

図3はヒトPJ01256遺伝子の発現組織解析の結果を示す。

図4はヒトPJ01256遺伝子の発現組織解析の結果を示す。

5 図5は正常卵巣及び腫瘍卵巣でのヒトPJ01256発現量を示す。

図6は正常脳及び脳腫瘍でのヒトPJ01256発現量を示す。

図7は正常副腎及び腫瘍副腎でのヒトPJ01256発現量を示す。

図8はヒトPJ01256とマウスPJ01256のアミノ酸配列を比較して示す。

10 図9はヒトPJ01256とマウスPJ01256のアミノ酸配列を比較して示す。

図10はマウスPJ01256遺伝子の発現組織解析の結果を示す。

図11はマウスPJ01256遺伝子のマウス胎児における発現を示す。

図12はマウスPJ01256 mRNAの性周期変動を示す。グリセルアルデ  
15 ヒド 3-リン酸脱水素酵素 (G3PDH) mRNAの性周期変動を対照として示す。図中、各数字はマウスの個体番号であり、それぞれのマウスの性周期は次のように判定された；1＝発情期；2＝発情後期～休止期；3＝発情後期；4＝発情前期～発情期；5＝発情後期。

図13はCOS7細胞で発現させたヒトPJ01256タンパク質の細胞外マトリックス (ECM) への局在を示す。図中、CはpCMH01をトランスフェクトしたCOS7細胞、PJはpCMH01-PJ01256をトランスフェクトしたCOS7細胞についての結果である。  
20

図14はヒト染色体クローンAC010269.5上のヒトPJ01256エクソンの位置を示す。

25 図15はヒト染色体クローンAC010269.5が5番染色体短腕15.31 (5p15.31) に存在することを示す。

図16はヒトPJ01256遺伝子を挿入した組換えバキュロウイルスDNA

調製用プラスミドベクターpFastBac1-HTのクローニング部位を示す。  
図中、イタリック文字は合成DNA挿入部分を示す。

図17はプラスミドpFastBac1-HT-PJ01256の構造を示す  
模式図である。

- 5 図18はプラスミドpFastBac1-MS/HT-PJ01256-2の  
構造を示す模式図である。

図19はプラスミドpFastBac1-MS/HT-PJ01256-1の  
構造を示す模式図である。

- 10 図20はヒトPJ01256の昆虫細胞/バキュロウイルス系での発現結果を  
示す。図中、HTはBacmid-HT-PJ01256、MSHT1はBac  
mid-MS/HT-PJ01256-1、及びMSHT2はBacmid-M  
S/HT-PJ01256-2を遺伝子導入したSf9細胞の培養上清を示す。  
それぞれ2クローンずつ遺伝子導入し、No. 1及びNo. 2として表示した。

- 15 発明を実施するための最良の形態

(新規なADAMTSファミリータンパク質)

- 本発明において提供される新規なADAMTSファミリータンパク質は、ヒト  
脳細胞中のmRNA由来のcDNAライブラリーから発現配列タグ(EST)分  
析(Adams, M. D., et al., Science(1991)252:  
20 1651-1656; Adams, M. D. et al., Nature(19  
92)355:632-634; Adams, M. D., et al., Nat  
ure(1995)377 Supp:3-174)を用いてTSP1ドメイン  
をマーカーとして釣上げられたcDNAクローン(配列表の配列番号2)の塩基  
配列から特異的に作成したプライマーを使用して、さらに5' RACE(Rap  
25 id amplification of cDNA end)法で取得された  
全長cDNA(配列番号3)がコードする新規なアミノ酸配列を有するものであ  
る。当該cDNAクローンにコードされるアミノ酸配列は配列表の配列番号1に、

該全長cDNAにコードされるアミノ酸配列は配列表の配列番号4に記載した。  
この新規なADAMTSファミリータンパク質のmRNAは、ヒトの卵巣で発現  
が高く、ついで腎臓、肺、胃、精巣、副腎、脾臓で発現量が高かった。また、脳、  
小腸、骨格筋、皮膚において中程度に発現していた。卵巣での発現が特に高かつ  
5 たことから、同タンパク質は卵の分化・成熟あるいは排卵ひいては受精等に関与  
することが考えられる。また、卵巣・心臓及び腎臓の腫瘍組織ではmRNAの発  
現量が正常組織に比べ著しく低下していたことから腫瘍に関連する遺伝子である  
ことが推定された。さらに、この新規遺伝子が、第5染色体短腕15.2-15.  
3 (5p15.2-15.3) に存在することを見い出した。5p15.2-1  
10 5.3は5P-症候群 (Cri-du-chat syndrome) の欠失部  
位であることが報告されていることから (Overhauser J, et al, Hum. Mol. Genet. (1994) 2:247-252)、該遺伝子  
と同症候群との関連が示唆された。また、本発明においては、上記新規なヒトA  
DAMTSファミリータンパク質のマウスのカウンターパートをも見い出し、こ  
15 れを提供する。このマウスADAMTSファミリータンパク質のcDNAの塩基  
配列は配列表の配列番号7に、該cDNAがコードするアミノ酸配列は配列番号  
8に記載した。

本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質は、公知データベース  
登録配列との相同性分析からADAMTSファミリーに属し、TSP1ドメイン  
20 及びレプロリシン型亜鉛メタロプロテアーゼ (Zn-metalloprotease) ドメインを有し、システイン-リッチ リージョン (Cysteine-rich region) を有することが判明した。

本タンパク質がADAMTSファミリータンパク質であること、またTSP1  
ドメインを有することから、ADAMTS1及びADAMTS8で報告されてい  
25 るのと同様に血管新生阻害作用を有することが示唆される。また、レプロリシン  
型亜鉛メタロプロテアーゼを有し、かつ卵巣で性周期に応じて発現が変動するこ  
とから、卵巣の細胞外マトリックスを基質として、その分解及び再構築に関与し

ていると考えられる。

(タンパク質、ポリペプチド又はペプチド)

本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質は、配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列と同一、又は実質的に同一なアミノ酸配列を含有するタンパク質である。当該新規なADAMTSファミリー含有タンパク質は、ヒトや哺乳動物のあらゆる細胞、又はそれらの細胞が存在するあらゆる組織に由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、実施例6及び7にみられる発現特性を保持する限りは特に限定されず、例えば、配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられる。

また、配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、さらに配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質等が例示される。実質的に同質の活性として、例えば同一ファミリーに属するADAMTS1及びADAMTS8で報告されているように、本発明に係る新規なタンパク質が血管新生阻害活性を有することも考えられるが、その活性測定方法としては、インビボ (in vivo) 法として、ニワトリ胚の漿尿膜 (chorioallantoic membrane) を用いるCAM法 (Moses M. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96:2645-2650)、ウサギやラットの目の角膜に少し切り目をつけて試料を入れ、そこに向か

って近くの細静脈から伸びてくる新生血管を観察する角膜法 (Gaudric A., et al., Ophthalmic Res. (1992) 24:181-188) 等を、インビトロ (in vitro) 法として、培養血管内皮細胞を用いてボイデンチャンバーで遊走を、単層培養で細胞の増殖を観察し、管腔形成は三次元のコラーゲンゲルやマトリゲル (IV型コラーゲン、ラミニン、ニドゲン/エンタクチン及びヘパラン硫酸よりなる再構成基底膜ゲル) で培養して観察する  
5 方法 (Haas T. L., et al., J. Biol. Chem. (1998) 273:3604-3610) 等をそれぞれ挙げることができる。

アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、cDNAの塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等が可能である。  
10

本発明に係る新規なADAMTSファミリーポリペプチドを含むタンパク質は「成熟」タンパク質の形態であってもよく、あるいは融合タンパク質のごとき大型のタンパク質の一部であってもよい。分泌又はリーダー配列、プロ配列、複数のヒスチジン残基のごとき精製を促進する配列、又は組換え生産を行っている間の安定性のためのさらなる配列を含むものであってもよい。  
15

本発明に係るポリペプチド又はペプチドは、配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分配列を有するポリペプチド又はペプチドを包含し、これらは例えば試薬・標準物質・免疫原として利用できる。その最小単位としては8個以上のアミノ酸、好ましくは10個以上のアミノ酸、より好ましくは12個以上、さらに好ましくは15個以上の連続するアミノ酸で構成されるアミノ酸配列からなり、好ましくは免疫学的に同定し得るポリペプチド又はペプチドを本発明の対象とする。これらのペプチドは、試薬若しくは標準物質、又は後述するように本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質に特異的な抗体を作製するための抗原として単独又はキャリア  
20 (例えば、キーホールリンペイトヘモシアニン又は卵白アルブミン) と結合して使用できるが、これらのように別種のタンパク質又は物質を結合したものも本

発明の範囲に包含される。部分配列は、「独立して存在するもの (free standing)」であるか、あるいはより大きなポリペプチド内に含まれていてもよく、その中で部分配列は一部分若しくはある領域を形成していてもよい。最も好ましくは、単一の連続した領域としてより大きなポリペプチドに含まれる。

- 5 さらに、このように特定されたポリペプチド又はペプチドを基にして、その生理活性（例えば血管新生抑制能）を指標とすることにより、1以上、例えば1ないし100個、好ましくは1ないし30個、より好ましくは1ないし20個、さらに好ましくは1ないし10個で、特に好ましくは1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペ
- 10 プチド又はペプチドも提供される。欠失、置換、付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法又はポリメラーゼ連鎖増幅法 (PCR) を単独又は適宜組み合わせ、例えば、Molecular Cloning; A Laboratory Manual、第2版、Sambrookら編、コールド・スプリング・ハーバー・
- 15 ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年；[ラボマニュアル遺伝子工学]、村松正實編、丸善株式会社、1988年；[PCRテク1989年等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばUlmerの技術 (Science (1983) 219:666) を利用できる。例えば、N末端を含む一連の残基が欠
- 20 失、又はC末端を含む一連の残基が欠失、あるいは一方がN末端でもう一方がC末端を含む2種の一連の残基が欠失していること以外は上記新規なADAMTSファミリータンパク質のアミノ酸配列を有する末端切断ポリペプチドを包含する。

- また、構造的又は機能的属性により特徴づけられる部分配列、例えばアルファヘリックス及びアルファヘリックス形成領域、ベータシート及びベータシート形成領域、ターン及びターン形成領域、コイル及びコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、アルファヘリックス親媒性領域、ベータシート親媒性領域、可変領域、表面形成領域、基質結合領域、及び高抗原性指標領域を含む部分配列等も好ましい。
- 25

また、生物学的に活性な領域も好ましく、類似の活性若しくは改善された活性のある、又は望ましくない活性を減じた部分配列等がある。動物、とりわけヒトにおいて抗原的又は免疫原的な部分配列もまた含まれる。

本発明に係るタンパク質、ポリペプチド及びそれらの部分配列ペプチドのアミノ酸配列は保存的アミノ酸置換により変化したものも含まれている。かかる典型的な置換は、Ala、Val、Leu及びIle間；Ser及びThr間；Asp及びGlu間；Asn及びGln間；並びに塩基性残基Lys及びArg間；あるいは芳香族残基Phe、Trp及びTyr間におけるものである。数個、5ないし10個、1ないし5個、又は1ないし2個のアミノ酸がいずれかの組み合わせで置換、欠失又は付加されているものが特に好ましい。

上記のような変異の導入において、当該タンパク質の基本的な性質（物性、活性、又は免疫学的活性等）を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等）の間での相互置換は容易に想定される。

なお、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質はペプチド結合又は修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個又はそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドを意味する。また、本明細書において、ペプチド、オリゴペプチド及びオリゴマーとも称する短鎖をポリペプチド、また、長鎖のものをタンパク質ということもある。

本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質は、20種の遺伝子によりコードされたアミノ酸とは異なるアミノ酸を含有することもできる。「タンパク質」には、プロセッシング及びその他の翻訳後修飾のような天然のプロセッシングにより修飾されたものが含まれるが、当業者に周知の化学修飾技術によっても修飾される。このような修飾は基礎的な参考書及びさらに詳細な論文並びに多数の研究文献にも詳しく記載されており、これらは当業者に周知である。

修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖及びN末端側又はC末端側等のポリペプ

チドの任意の部位で行われ得る。同一の型の修飾は該ポリペプチドの幾つかの部位で、同一又は異なる程度で存在し得る。また、タンパク質は多くの型の修飾をも含み得る。タンパク質は、ユビキチネーションの結果として分枝状であってもよく、分枝を伴う又は伴わない環状のものであってもよい。環状、分枝状及び分枝状かつ環状のタンパク質は翻訳後の天然プロセッシングにより生じるものであってもよく、あるいは合成法により製造されるものであってもよい。

修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、  
10 交差架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、交差架橋共有結合形成、シスチン形成、ピログルタメート形成、ホルミル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク加水分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、及びセレノイル化、アルギニル化のよう  
15 なトランスファーRNA媒介のタンパク質へのアミノ酸の添加、並びにユビキチネーション等がある。

例えば、Proteins-Structure and Molecular Properties、第2版、T. E. Creighton、W. H. Freeman and Company、ニューヨーク、1993年及びPost-translational Covalent Modification of Proteins、B. C. Johnson編、アカデミックプレス、  
20 ニューヨーク、1983年のWold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspective and Prospects、1-12頁; Seifter et al., Meth. Enzymol. (1990) 182: 626-646及びRattan et al., Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann.

N. Y. Acad. Sci. (1992) 663:48-62参照。

さらに、本発明に係るポリペプチド等の検出若しくは精製を容易にするために、又は別の機能を付加するために、N末端側やC末端側に別のタンパク質、例えばアルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリン

5 Fc断片、Myc-tag、His-tag、又はFLAG-tag等のペプチドを直接又はリンカーペプチド等を介して間接的に遺伝子工学的手法等を用いて付加することは当業者には容易であり、これらの別の物質を結合したポリペプチド等も本発明の範囲に包含される。なお、ヒト以外の動物種の相同遺伝子産物も当然本発明の範囲に包含される。

10 (ポリヌクレオチド)

一つの態様において、本発明に係るポリヌクレオチド及びその相補鎖は、本発明に係るポリペプチド等、例えば配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド及び該ポリヌクレオチドに対する相補鎖を意味する。好ましいポリヌクレオチド

15 の塩基配列は、配列表の配列番号2又は配列番号3又は配列番号7に記載した。

別の態様において本発明は、本発明に係るポリペプチド又はペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、好ましくは配列表の配列番号2又は配列番号3又は配列番号7の塩基配列からなるポリヌクレオチド又はその相補鎖の対応する領域にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

20 ポリヌクレオチドを提供する。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば、Molecular Cloning; A Laboratory Manual、第2版、Sambrookら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年等に

25 従うことができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は一般に知られたものであるが、その一例としては、50%ホルムアミド、5×SSC (150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)、50mM リン酸

ナトリウム、pH 7.6、5×デンハーツ溶液、10%デキストラン硫酸、及び  
20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性剪断サケ・精子DNAを含む溶液中、42°Cで一晩ハイブ  
リダイゼーションした後、室温で2×SSC・0.1%SDS中で一次洗浄し、  
次いで、約65°Cにおいて0.1×SSC・0.1%SDSで二次洗浄といった  
5 条件であってもよい。

これらのポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチド、特に配列表の配列番号  
2又は配列番号3又は配列番号7の塩基配列からなるポリヌクレオチド又はその  
相補鎖にハイブリダイズするものであれば必ずしも相補的配列でなくとも良い。  
例えば、配列表の配列番号2又は配列番号3又は配列番号7の塩基配列又はその  
10 相補的配列に対する相同性において、少なくとも約40%、例えば、約70%以  
上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは  
約95%以上である。また本発明に係るポリヌクレオチドは、指定された塩基配  
列の領域に対応する連続する10個以上の、好ましくは15個以上の、より好ま  
しくは20個以上のヌクレオチドからなるポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオ  
15 チド及びこれらの相補鎖を包含する。ここで、本発明に係る新規なADAMTS  
ファミリータンパク質又はこれと同様の活性を有するポリペプチドをコードする  
ポリヌクレオチドの塩基配列の決定は、例えば公知のタンパク質発現系を利用し  
て発現タンパク質の確認を行い、その生理活性を指標にして選別することにより  
行なうことができる。無細胞タンパク質発現系を利用する場合は、例えば胚芽、  
20 家兔網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる(Nature (19  
57) 179:160-161)。

上記本発明に係るポリヌクレオチドは、本発明に係るポリペプチド等の製造に  
おいて、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質をコードする核  
酸、例えばその遺伝子若しくはmRNAの検出用プローブ若しくはプライマー  
25 (primer)として、又は遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴ  
ヌクレオチド等として有用である。その意味で、本発明に係るポリヌクレオチド  
及びオリゴヌクレオチドは翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものも包

含する。例えば、アンチセンスによって本発明に係る新規なADAMTSファミリー含有タンパク質の発現を特異的に阻害するためには、当該ADAMTSファミリータンパク質に固有な領域の塩基配列を用いることが想定される。一方、保存配列を用いることにより当該ADAMTSファミリータンパク質を含む複数の

5 ADAMTSファミリータンパク質又はTSP1含有タンパク質の発現を同時に抑制することも可能と考えられる。

本発明に係るポリヌクレオチドは、一般的には、修飾されていないRNA若しくはDNA、又は修飾されたRNA若しくはDNAであってもよい。「修飾されたRNA若しくはDNA」は、安定性又はその他の理由により、修飾された塩基を

10 有するDNA又はRNA、並びに修飾された骨格を有するDNA又はRNAを包含する。「修飾された」塩基は、例えば、トリチル化塩基及びイノシンのごとき通常でない塩基を包含する。また、「修飾された」骨格は、フォスフォジエステル骨格が、例えばフォスフォロチオエート (phosphorothioate) 骨格及びモルフォリノ (morpholino) 骨格のごとき通常でない骨格を

15 包含する。種々の修飾がDNA及びRNAについて行われており、典型的に天然において見いだされるポリヌクレオチドの化学的、酵素的又は代謝的に修飾された形態、並びにウイルス及び細胞に特徴的なDNA及びRNAの化学的形態を包含する。また、「RNA若しくはDNA」は、しばしば「オリゴヌクレオチド」と称する短いポリヌクレオチドを包含する。

20 本発明に係るポリヌクレオチドは、対象のRNA、DNAによりコードされるアミノ酸配列を変化させるものであってもよく、対象配列によりコードされるポリペプチドにおけるアミノ酸の置換、付加、欠損、融合及び末端切断を招く場合があるが、本発明はこれらのものも包含する。これらの変化は1又はそれ以上の置換、付加、欠損が任意の組み合わせで起こることにより、アミノ酸配列が変化

25 し得るものであり、これらの変化は、突然変異技術、直接的合成、及び当業者に既知のその他の組換え技術により製造できる。

本発明に係るポリヌクレオチドの塩基配列及びポリペプチドのアミノ酸配列の

同一性は、本発明に係るRNA、DNA又は本発明に係るタンパク質の同一性の尺度である。一般的には、最高の合致が得られるように配列を並置する。同一性はそれ自体当該分野において認識された意味を有し、公表された方法を用いて算出できる。

- 5  例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 編、オックスフォード・ユニバーシティー・プレス、ニューヨーク、1988年；Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編、アカデミック・プレス、ニューヨーク、1993年；Computer Analysis  
10 s of Sequence Data, パートI, Griffin, A. M. 及びGriffin, H. G. 編、ヒューマン・プレス、ニュージャージー、1994年；Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heijne, G., アカデミック・プレス、1987年；及びSequence Analysis Primer, Gribskov, M. 及びDevereux, J. 編、エム・ストックトン・プレス、  
15 ニューヨーク、1994年に記載の方法が利用できる。二つの配列の同一性を測定する方法は多くあるが、用語「同一性」は当業者によく知られている（Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heijne, G., アカデミック・プレス、1987年；Sequen  
20 ce Analysis Primer, Gribskov, M. 及びDevereux, J. 編、Mストックトン・プレス、ニューヨーク、1991年；並びにCarillo, H. and Lipman, D., SIAM J. Applied Math. (1988) 48:1073）。

- 25  配列間の同一性又は類似性を測定するために通常用いられる方法はCarillo, H. and Lipman, D., SIAM J. Applied Math. (1998) 48:1073等が開示されているが、これらに限定するものではない。同一性及び類似性を決定する方法は、公に入手できるコンピュータ

ープログラムに集成されている。二つの配列間の同一性及び類似性を測定する好ましいコンピュータプログラム法には、GCGプログラムパッケージ (Dev  
ereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984) 12 (1): 387)、BLASTP、BLASTN、及びFA  
5 STA (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215: 403) 等があるが、これらに限定するものではない。

さらにまた、本発明におけるポリヌクレオチドの別の態様は、上記ポリヌクレ  
オチド又はその相補鎖をエクソンとして含有するヒトゲノム遺伝子断片たるポリ  
ヌクレオチド、該ポリヌクレオチド又はその相補鎖をなす塩基配列の少なくとも  
10 約15個の連続する塩基配列からなるポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチド又  
はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌ  
クレオチドを包含する。

上記本発明に係るポリヌクレオチドは、例えば上記新規なADAMTSファミ  
リータンパク質の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸  
15 に関する試薬・標準品としても利用できる。例えば、上記ポリヌクレオチドをマ  
ーカー又はプライマーとして、後述するように、上記ポリヌクレオチドの変異や  
発現に関連する疾病の診断方法に使用できる。また、後述するように、当該疾病  
の防止及び／又は治療に用いる医薬組成物の成分の一つとして用いることができ  
る。

## 20 (形質転換体)

本発明は、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞、並びにカイコ、マウ  
ス、ラット、ウシ、ヒツジ、ウマ等の実験動物等の自体公知の宿主を利用した遺  
伝子組換え技術によっても、又は本発明に係るDNA由来のRNAを用いた無細胞  
タンパク質合成法により、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパ  
25 ク質及びその由来物からなるペプチド及びポリペプチドは提供可能である。後述  
する実施例では、哺乳動物由来のCOS7細胞及び昆虫細胞系を宿主として利用  
し、上記ポリペプチドを遺伝子工学的に発現した。

形質転換は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法であるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系の利用である。ベクターは、

5 選択した宿主の種類により選別され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。組合せは原核細胞、真核細胞によって分別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー、マーカー配列、転写配列、非翻訳配列、スプライシング及びポリアデニル化シグナル、mRNAを安定化する配列のごとき非コーディング5' 及び3' 配列等を自体公知の方法によって組合せ利用できる。なお、

10 マーカー配列は、pQEベクター(QIAGEN社製)中に提供されるようなヘキサ-ヒスチジンペプチド(Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1989) 86:821-824に記載される)又はHAタグ(Wilson et al., Cell (1984) 37:767)

15 が好適に例示される。

DNAの宿主細胞への導入は、例えば、Davisら、Basic Methods in Molecular Biology、1986年; Molecular Cloning; A Laboratory Manual、第2版、Sambrookら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年の如き多くの

20 標準的な実験マニュアルに記載される方法により行なうことができ、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレーブ負荷(s

25 crape loading)、バリスティック導入(ballistic introduction) 及び感染等がある。

適当な宿主の代表的なものには、細菌細胞、例えば連鎖球菌属(strept

ococci)、ブドウ球菌属(staphylococci)、大腸菌(E. coli)、ストレプトミセス(Streptomyces)及び枯草菌(Bacillus subtilis)細胞;真菌細胞、例えば酵母細胞及びアスペルギルス属(Aspergillus)細胞;昆虫細胞、例えばドロソフィラS2(Drosophila S2)及びスボドプテラSf9(Spodoptera Sf9)細胞;動物細胞例えばCHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293及びボウズ(Bows)メラノーマ細胞;並びに植物細胞等がある。

ベクターには、染色体、エピソーム及びウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス及びレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、並びにそれらを組み合わせたベクター、例えばプラスミド及びバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミド及びファージミド等がある。

発現系の構築物には発現を制御及び引き起こす調節領域を含有させることができる。通常、宿主中にDNAを保持、伸長又は発現するためには、タンパク質を発現するのに適した任意の系又はベクターを選択することが必要となる。これらは周知の技術により適当なDNA配列を発現系に挿入することができ、例えば、Molecular Cloning; A Laboratory Manual、第2版、Sambrookら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年に記載されている。また、翻訳タンパク質を、小胞体内腔、ペリプラスミックススペース又は細胞外環境へ分泌させるために、適当な分泌シグナルを発現するタンパク質に組み込むことができる。これらのシグナルはタンパク質に本来的なものであってもよく、あるいは異種性のシグナルであってもよい。

形質転換体は、各宿主の培養に最適な自体公知の条件を選択して培養される。

培養は、発現産生される本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド及びポリペプチドの生物活性をマーカーにして行なってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養又はバッチ培養によって行ってもよい。

- 5 目的とするタンパク質、ポリペプチド又はペプチドが上記形質転換体の培養培地中に分泌される場合は、該培地を回収し、該培地から精製することによりそれらを得ることができる。さらに、それらが上記形質転換体の細胞内に生成される場合は、まず細胞を溶解し、次いで、タンパク質を回収することによって目的の
- 10 タンパク質、ポリペプチド又はペプチドを得ることができる。また、目的とするタンパク質、ポリペプチド又はペプチドをスクリーニングアッセイのために発現させる場合、一般的には、細胞表面にタンパク質を生産させるのが好ましい。この場合、スクリーニングアッセイに使用する前に細胞を集めてもよい。

- また、カイコ、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、ウマ等の実験動物等に本発明に係る遺伝子を導入して組換え動物を作製し、目的とするタンパク質を当該動物
- 15 の生体内で発現させることも可能である。このような技術は、当該分野においては公知である。

(新規なADAMTSファミリードメイン含有タンパク質及びその由来物の精製・回収)

- 本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド及びポリペプチドは、ヒトやその他哺乳動物の細胞、組織、培養され
- 20 た該細胞若しくはその培養培地(細胞培養物)、上記遺伝子組換え技術により作製した細胞又はその培養物、又は上記遺伝子組み換え技術により作製した組換え動物由来の試料、例えば細胞、組織、乳汁、血液、尿等から周知の精製方法により得ることができる。その方法には例えば硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、
- 25 酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィー

一等がある。これらの方法は適宜組み合わせてもよい。好ましくは、アミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列を認識する抗体を作成し、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。また、高速液体クロマトグラフィーを精製に用いるのが最も好ましい。簡便には、  
5 ヘパリンを利用した親和性クロマトグラフィーが利用できる。さらに、精製過程において、生理活性（例えば血管新生抑制能）を指標にして、精製の確認を行うこともできる。タンパク質が単離及び／又は精製中に変性した場合、再び活性な立体配座にするために、タンパク質再生のための周知の技法を用いることができる。

（抗体）

- 10 抗体は、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチド、あるいはそれらの抗原決定基を含むペプチドから選択したものを抗原として用いて作製する。抗原は当該ADAMTSファミリータンパク質自体又はその断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上  
15 のアミノ酸で構成される。当該ADAMTSファミリータンパク質に免疫特異的な抗体を作製するためには、新規なADAMTSファミリータンパク質に固有な配列からなる領域を用いることが好ましい。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8と相同である必要はなく、タンパク質の立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位がアミノ酸の一次  
20 配列上で不連続部位であったとしても当該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は、当該ADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチドを免疫学的に結合又は認識する限り特に限定されない。この結合又は認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定される。「免疫特異的」とは、先行技術の他の関連タンパク質に対する親和性より  
25 も、当該ADAMTSファミリータンパク質に対する親和性が実質的に大きいことを意味する。

抗体の生産は、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質、その

由来物からなるペプチド又はポリペプチドを、アジュバントの存在又は非存在下で、単独又は担体に結合して、動物に対して体液性応答及び／又は細胞性応答等の免疫誘導を行なうことによって行われる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得される。好ましい手段としては、免疫アフィニティークロマトグラフィー法である。

モノクローナル抗体の生産は、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞（例えば、脾臓又はリンパ節由来）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P 3-X 6 3-A g 8株等のミエローマ株）への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、上記抗体産生細胞と永久増殖性細胞とから作成されたハイブリドーマをクローン化し、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質を特異的に認識する抗体を産生しているハイブリドーマを選別し、  
15 該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。実例としては、ハイブリドーマ法(Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256:495-497); トリオーマ法(Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72); 及びEBV-ハイブリドーマ法(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, Inc., (1985): 77-96) に記載されるような種々の技法がある。

一本鎖抗体の産生のために記載された技術(米国特許第4946778号)は、本発明に係るタンパク質に対する一本鎖抗体を産生するのに適用できる。また、トランスジェニックマウス、又は他の哺乳動物を包含する他の生物を用いて、  
25 哺乳動物における免疫学的反応を誘起する方法によりヒト化抗体を発現させてもよい。

上記抗体は、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質を発現す

るクローンの単離又は同定、あるいは親和性クロマトグラフィーによる該タンパク質の精製に使用できる。

また、上記抗体を用いて、当該新規なADAMTSファミリータンパク質が関与する疾患の診断及び治療に使用できる。

5 (スクリーニング及びスクリーニングされた化合物)

- かくして調製された新規なADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチド及びその相補鎖、これらのアミノ酸配列及び塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、又はこれらを用いるタンパク質合成系並びに当該ADAMTSファミリー
- 10 タンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独又は複数手段を組合せることによって、当該ADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド及びポリペプチドに対する活性阻害剤又は活性賦活剤のスクリーニングに有効な手段を提供する。例えば、ペプチド又はポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選
- 15 別、タンパク質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現調整剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等を、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施可能である。ADAMTSファミリータンパク質は哺乳動物宿主に広く存在し、多くの生物学的機能に関与しており、多くの疾患にも関わっている。したがって、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質を、その活
- 20 性を阻害又は促進する作用を有する化合物を見い出すためのスクリーニングに用いることは有用である。

- 具体的には、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチドを用いて、スクリーニングの対象とされる化合物とこれらペプチド又はポリペプチドとの間の相互作用を可能にする条
- 25 件を選別し、この相互作用の有無を検出することのできるシグナル及び／又はマーカー（第2の成分）を使用する系を導入し、次いで、このシグナル及び／又はマーカーの存在又は不存在又はその変化（量的変化及び／又は質的变化を含む）

を検出することにより、当該ADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド及びポリペプチドの活性を賦活又は阻害する化合物をスクリーニング可能である。例えば、当該ADAMTSファミリータンパク質を用いて、スクリーニングの対象とされる化合物中で小型分子基質及びリガンドの結合を評価してもよい。これらの基質及びリガンドは天然の基質及びリガンドであってもよく、あるいは構造又は機能を模倣したものであってもよい (Coligan et al., Current Protocols in Immunology (1991) 1 (2): Chapter 5 参照)。

さらにまた、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質のcDNA、タンパク質及び該タンパク質に対する抗体を用いて、細胞における当該ADAMTSファミリータンパク質のmRNA及びタンパク質の産生に対する添加化合物の影響を調べるためのスクリーニングアッセイを行ってもよい。例えば、当該分野で知られた一般的方法により、モノクローナル及びポリクローナル抗体を用いて、当該ADAMTSファミリー含有タンパク質の分泌又は細胞結合レベルを測定するための酵素免疫固相法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (ELISA) を構築してもよく、また、これを用いて当該ADAMTSファミリータンパク質の産生を阻害又は促進し得る因子を適当に処理された細胞又は組織から見い出すこともできる。スクリーニングアッセイを行なうための一般的方法は当該分野においてよく知られたものである。

スクリーニングの対象とされる化合物としては、例えば細胞、無細胞調製物、化学ライブラリー及び天然産物混合物等が挙げられる。

このようにしてスクリーニングされた化合物は、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド及びポリペプチドについての活性阻害剤、活性拮抗剤、活性賦活剤の候補化合物として利用可能である。また、遺伝子レベルでの当該ADAMTSファミリータンパク質及びその由来物に対する発現阻害剤、発現拮抗剤、発現賦活剤の候補化合物としても利用可能である。それらは、ADAMTSファミリータンパク質に由来する各種症状の

予防・治療効果を期待できる。上記スクリーニング方法により選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性とのバランスを考慮してさらに選別することによって、医薬組成物として調製可能である。

(医薬組成物)

- 5 本発明において提供される新規なADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチド及びその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター、当該ADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチドを免疫学的に認識する抗体、並びに上記スクリーニング方法により選別された化合物は、当該
- 10 ADAMTSファミリー含有タンパク質の活性阻害・拮抗・賦活等の機能を利用した治療薬等の医薬手段として使用可能である。なお、製剤化にあたっては、自体公知のペプチド又はポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、又は抗体等それぞれに応じた製剤化方法を導入すればよい。

- 例えば、本発明は、抗体及び／又はT細胞を産生させるに十分な上記新規な
- 15 ADAMTSファミリータンパク質又はその断片を哺乳動物に接種して、哺乳動物における免疫学的反応を誘起する方法による治療にも使用できる。

本発明はさらに、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質をインビボで発現させるための核酸ベクターを送達して、かかる免疫学的応答を誘導し、該動物を疾患から保護する抗体を生じさせることに使用できる。

- 20 さらに、本発明は、哺乳動物宿主中に導入された場合、上記新規なADAMTSファミリータンパク質に対する哺乳動物の免疫学的応答を誘導させる免疫学的ワクチン処方（組成物）に使用できる。該組成物は当該新規なADAMTSファミリータンパク質又は該タンパク質をコードする遺伝子を含んでなる。ワクチン
- 25 処方は、さらに適当な担体を含んでいてもよい。当該ADAMTSファミリータンパク質は胃で分解される可能性があるため、好ましくは非経口投与する。非経口投与としては、例えば皮下筋肉内、静脈、皮内等への注射による投与が挙げられる。非経口投与に適した処方、抗酸化剤、バッファー、制細菌剤及び処方を

レシビエントの血液と等張にする溶質を含んでいてもよい水性又は非水性滅菌注射用溶液；並びに懸濁剤又は増粘剤を含んでいてもよい水性又は非水性滅菌懸濁液を包含する。処方をして1回量又は複数回量として容器に入れて提供してもよく、例えば、密封アンプル及びバイアルに入れて提供してもよく、また使用直前に滅菌液体担体の添加のみを必要とする凍結乾燥状態として保存してもよい。またワクチン処方は、水中油系及び当該分野で知られた他の系のごとき処方の免疫原性を高めるためのアジュバント系を含んでいてもよい。用量は、個々のワクチンの活性に左右され、通常の実験により容易に決定できる。

本発明は、ADAMTSファミリータンパク質の関与する生体機能の解明、例えば、卵の成熟及び排卵・受精のプロセスの解明、癌化のプロセスの解明、血管新生のプロセス解明や血管新生に関連する疾患（血管新生病又は血管新生不全症等）の解明、予防、治療及び診断を可能とする上で非常に有用なものになると期待される。また、本発明は、血管新生が原因となる疾患（いわゆる血管新生病）、例えば固形悪性新生物、眼科的疾患（増殖性糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、虹彩ルベオーシス、鎌状赤血球網膜症、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、網膜中心動脈閉塞症、老人性円板状黄斑変性症、その他虚血をきたす眼科疾患）、慢性関節リウマチ、血管腫、血管線維腫、尋常性乾癬、粥状動脈硬化巣外膜の異常毛細血管網等、また逆に血管新生が不十分である血管新生不全症、例えば虚血性心疾患、下肢の閉塞性動脈硬化症での側副血行路形成不全や、創傷治癒過程での血管新生が不十分なことによる難治性皮膚潰瘍、難治性胃潰瘍、手術後の癒合不全等の治療方法を提供する。さらに、本発明遺伝子の発現が性周期と関連しており、排卵に伴う卵巣の細胞外マトリックスの分解及び再構築に関与することが示唆されたことから、該細胞外マトリックスの分解及び再構築に関連する疾患の解明、防止及び／又は診断・治療にも有用である。すなわち、排卵障害による不妊症の解明、防止及び／又は診断・治療に有用であり、また逆に避妊にも有用である。また、本発明遺伝子が第5染色体短腕15.2-15.3（5p15.2-15.3）に存在することを確認したこと、5p15.2-15.3は5P

一症候群 (Cri-du-chat syndrome) の欠失部位であることが報告されていることから、本発明遺伝子は5P-症候群の解明、防止及び／又は診断・治療にも有用である。

本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質及びその活性が過剰な  
5 場合、有効量の上記阻害剤化合物を医薬上許容される担体とともに対象に投与して、当該ADAMTSファミリータンパク質の活性を阻害し、そのことにより異常な症状を改善することもできる。

さらに、発現ブロック法を用いて内在性の上記ADAMTSファミリータンパク質をコードしている遺伝子の発現を阻害してもよい。細胞内で生成した、ある  
10 いは別個に投与されたアンチセンス配列を、かかる知られた方法に使用する (例えば、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988) 中、O'Conor, J. Neurochem (1991) 56:560参照)。別法として、遺伝子と  
15 とともに三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを用いてもよい (例えば、Lee et al., Nucleic Acids Res (1979) 6:3073; Cooney et al., Science (1988) 241:456; Dervan et al., Science (1991) 251:1360参照)。これらのオリゴヌクレオチドはそれ自体投与することができ、あるいは  
20 関連オリゴマーをインビボで発現させることもできる。

本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質及びその活性の発現不足に関連する異常な症状の治療には、1つの方法として当該ADAMTSファミリータンパク質自体あるいはこのタンパク質をコードする遺伝子を活性化する治療上有効量の化合物 (促進剤) を医薬上許容される担体とともに投与し、そのこ  
25 とにより異常な症状を改善することを特徴とする方法が挙げられる。別法として、遺伝子治療を用いて、対象中の細胞による当該ADAMTSファミリータンパク質の細胞内での生成を有効ならしめてもよい。例えば、上記のごとく本発明に係

るポリヌクレオチドを処理加工して複製欠損レトロウイルスベクターに入れて発現するようにしてもよい。次いで、レトロウイルス発現構築物を単離し、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質をコードしているRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入したパッケージング細胞中に導入して、今度はパッケージング細胞が目的遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を生成するようにしてもよい。インビボでの細胞の処理加工及びインビボでのタンパク質の発現のために、これらのプロデューサー細胞を対象に投与してもよい。遺伝子治療の概説としては、Human Molecular Genetics, T. Strachan and A. P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd(1986)中、第20章、Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches (及びその中の引用文献) 参照。もう1つの方法は、適当な医薬担体と混合して治療量の上記新規なADAMTSファミリータンパク質を投与することである。

本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチドあるいは化合物の処方及び投与形態は、適当な医薬担体と組み合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量のタンパク質又は化合物、及び医薬上許容される担体又は賦形剤を含む。かかる担体としては、セイライン、緩衝化セイライン、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、及びそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方は投与経路に適したものとすべきであり、当業者によく知られている。さらに本発明は、上記本発明成分の1種又はそれ以上を充填した、1個又はそれ以上の容器を含んでなる医薬パック及びキットにも関する。

本発明に係るタンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチド及び化合物は単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物と一緒に使用してもよい。医薬組成物の全身投与の好ましい形態は、注射であり、とりわけ静脈注射である。皮下、筋肉内又は腹腔内のような他の注射経路を用いることも

できる。全身投与の別の手段としては、胆汁酸塩又はフシジン酸又は他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜又は経皮投与が挙げられる。さらに、腸溶処方又はカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。これらのタンパク質又は化合物の投与は局所的なものであってもよく、膏薬、パスタ、  
5 ゲル等の形態であってもよい。

必要な用量範囲は、ペプチド、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、及び担当医師の判断による。しかしながら、適当な用量は対象の体重1 kgあたり0.1ないし100  $\mu$ gの範囲である。しかしながら、種々の使用タンパク質及び化合物、種々の投与経路のさまざまな有効性を考慮すれば、必要な用量はさら  
10 に広範囲なものである。例えば、経口投与には静脈注射よりも多い用量が必要である。当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行なうことができる。

遺伝子治療において、治療に使用するタンパク質を対象中において生成させることもできる。例えば、タンパク質をコードしているDNA又はRNAを用いて、  
15 例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いることによりエキスピボ (ex vivo) において対象由来の細胞を処理加工し、次いで、細胞を対象に導入することもできる。

#### (診断薬及び診断方法)

また本発明からなる新規なADAMTSファミリータンパク質及びその由来物  
20 からなるペプチド又はポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチド及びその相補鎖、並びに当該ADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を単独で、診断マーカーや試薬等として使用可能である。また、これらのうちの1種又はそれ以上を充填した、1個又はそれ以上の容器を含んでなる試薬キットも提供する。  
25 なお、製剤化にあたっては、自体公知のペプチド又はポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、又は抗体等それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

診断方法としては、例えば本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパ

ク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチドをコードしている核酸との相互作用・反応性を利用して、相応する核酸の存在量、及び／又は当該タンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチドについて個体中の生体内分布、及び／又は個体由来の試料中の存在、及び／又は個体由来の試料中の存在  
5 量を、自体公知の方法を利用して測定し、それらの存在の有無及び／又は存在量の変化（増加又は減少）により、本発明に係る当該ADAMTSファミリータンパク質及びその由来物からなるペプチド又はポリペプチドの発現又は活性に関連する疾患の有無及び／又はその変化（増悪又は軽減）を判定できる。すなわち、当該ADAMTSファミリータンパク質及び／又は核酸をマーカーとして検査す  
10 るのである。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、又はPCR反応系等を利用すればよい。

診断用の核酸は、個体由来の試料、例えば細胞、血液、尿、唾液、組織生検又は剖検材料等から得られる。ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCR若しくはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅して  
15 もよい。RNA又はcDNAを同様に用いてもよい。正常遺伝子型との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失及び挿入を検出できる。増幅DNAを標識した上記ADAMTSファミリータンパク質をコードするDNAにハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定できる。RNAアーゼ消化により、又は融解温度の差により、完全に対合した配列を誤対合二重らせんから区別  
20 できる。DNA配列の相違はまた、変性物質を含有する又は含有しないゲル中のDNA断片の電気泳動における移動度の変化を検出することにより、又は直接的なDNA配列決定により検出できる（例えば、Meyers et al., Science (1985) 230:1242参照）。特異的な位置での配列の変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNAアーゼ及びS1保護又は化学  
25 的切断法によっても明らかにすることができる（例えば、Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1985) 85:4397-4401参照）。また、上記ADAMTSファミリータンパク質をコー

ドするDNA又はその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイ (array) を構築して、例えば遺伝学的変異の効果的なスクリーニングを行なうことができる。アレイ法はよく知られており、広い適用範囲を有し、遺伝子発現、遺伝学的連関、及び遺伝学的変異可能性を包含する分子遺伝学における種々の問題を調べるために用いられ得る (例えば、M. Chee et al., Science (1996) 274:610参照)。

また、本明細書記載の方法によって上記ADAMTSファミリータンパク質をコードするDNAの変異・減少・増加を検出することにより、細胞・組織の癌化のレベルを診断する方法を提供する。また、本発明遺伝子が5p15.2-15.3に存在することを確認したこと、5p15.2-15.3は5P-症候群 (Cri-du-chat syndrome) の欠失部位であることが報告されていることから、本発明に係るDNAの変異・減少・増加を検出することで、5P-症候群の診断方法も提供する。さらに、本発明に係るDNAの変異・減少・増加を検出することで、血管新生が原因となる疾患 (いわゆる血管新生病) として固形悪性新生物、眼科的疾患 (増殖性糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、虹彩ルベオーシス、鎌状赤血球網膜症、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、網膜中心動脈閉塞症、老人性円板状黄斑変性症、その他虚血をきたす眼科疾患)、慢性関節リウマチ、血管腫、血管線維腫、尋常性乾癬、粥状動脈硬化巣外膜の異常毛細血管網等、また、逆に血管新生が不十分である血管新生不全症として虚血性心疾患、下肢の閉塞性動脈硬化症での側副血行路形成不全や、創傷治癒過程での血管新生が不十分なことによる難治性皮膚潰瘍、難治性胃潰瘍、手術後の癒合不全等の診断方法又はかかる疾病に対する感受性の診断方法を提供する。

さらに、対象由来の試料について上記ADAMTSファミリータンパク質又は当該ADAMTSファミリータンパク質のmRNAレベルを調べることを特徴とする方法によって、細胞・組織の癌化のレベルを診断する方法を提供する。また、本発明遺伝子が5p15.2-15.3に存在することを確認したこと、5p15.2-15.3は5P-症候群 (Cri-du-chat syndrome)

- e) の欠失部位であることが報告されていることから、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質のmRNAレベルを検出することで、5P-症候群の診断方法を提供する。さらに本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質のmRNAレベルを検出することで、血管新生が原因となる疾患（いわゆる血管新生病）として固形悪性新生物、眼科的疾患（増殖性糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、虹彩ルベオシス、鎌状赤血球網膜症、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、網膜中心動脈閉塞症、老人性円板状黄斑変性症、その他虚血をきたす眼科疾患）、慢性関節リウマチ、血管腫、血管線維腫、尋常性乾癬、粥状動脈硬化巣外膜の異常毛細血管網等、また、逆に血管新生が不十分である血管新生不全症として虚血性心疾患、下肢の閉塞性動脈硬化症での側副血行路形成不全や、創傷治癒過程での血管新生が不十分なことによる難治性皮膚潰瘍、難治性胃潰瘍、手術後の癒合不全等を診断することができる。また、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質のmRNAのレベルを検出することで、細胞・組織の癌化のレベルを診断する方法を提供する。
- 15 本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質をコードするDNAの発現の増加又は低下は、ポリヌクレオチドの定量法として当該分野では周知方法の任意の方法、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNAアーゼ保護、ノーザンブロットティング及びその他のハイブリダイゼーション法を用いてRNAレベルで測定できる。また、試料中の当該ADAMTSファミリータンパク質レベルを決定
- 20 するために用いることができるアッセイ法は当業者に周知である。このようなアッセイ法には、ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、ウェスタンブロット分析及びELISAアッセイ等がある。
- 本発明に係るポリヌクレオチドの染色体の同定（染色体アッセイ）にも価値がある。該ポリヌクレオチドの配列は、個々のヒト・染色体上の特定の位置を標的とし、これにハイブリダイゼーションし得る。本発明による重要な配列の染色体へのマッピングは、それらの配列を遺伝子関連疾病と関連づける重要な第1工程である。配列を正確な染色体位置にマッピングしたならば、染色体上の配列の物
- 25

理的位を遺伝学的地図のデータと関連づけることができる。かかるデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで利用できる)に見いだされる。次いで、連鎖（物理的に近接した遺伝子の同時遺伝）の分析により、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾病との関係を同定する。罹病個体と未罹病個体との間のcDNA又はゲノム配列の相違も調べることができる。罹病個体のいくつか又は全部において変異が観察されるが正常個体においては観察されない場合、その変異は疾病の原因である可能性がある。

10

#### 実施例

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

#### 実施例 1

##### 15 (ヒト脳由来cDNAライブラリーの構築と遺伝子の分取)

市販ヒト脳、胎児脳、及び脳海馬由来のpolyA<sup>+</sup>RNA（クロンテック社製：カタログNo. 6516-1、6525-1、及び6578-1）を出発原料として常法によりcDNAライブラリーを構築し、dbEST (database of Expressed Sequence Tags) 分析によりcDNA断片を単離して塩基配列を決定し、本発明に係る新規なADAMTSファミリータンパク質をコードする塩基配列を担持するDNAを得た。

具体的には、小原らの方法 (DNA Research (1997) 4:53) に従って調製した上記ヒト脳由来のcDNAライブラリーから、約50,000個の組換え体をランダムに選択し、このうち約30,000個のクローンのcDNAについて、その5'末端及び3'末端の塩基配列を決定した。さらに約1,100個を主にインビトロの転写翻訳実験によって選択し、それらのcDNAの塩基配列を小原らの方法（同上）に従って決定した。全塩基配列の決定を行った

25

cDNAクローンについて、コンピュータプログラムを用いた汎用解析方法によってタンパク質コード領域 (ORF) を予想し、この領域について Pfam HMM Search (HMMPFAM) によりドメイン検索を行い、TSP1ドメイン (TSP1) を有するcDNAを同定した。

- 5 この様にして本発明者は、TSP1を担持する配列表の配列番号1に記載した推定アミノ酸配列 (全アミノ酸数1021個) からなる新規なADAMTSファミリータンパク質をコードするcDNA (配列表の配列番号2) を有するクローンPJ01256 (ヒト脳由来cDNAクローンPJ01256) を得た。なお、配列は、UPAC-IUB Commission on Biochemical
- 10 l Nomenclatureによる略号或いは当該技術分野における慣用略号に基づくものであり、またアミノ酸に関し光学異性体が有り得る場合は、特に明示しない限りL体を示すものとする。

## 実施例2

- 15 (ヒトPJ01256全長cDNA取得)

ヒトPJ01256の全長アミノ酸コード領域を有するcDNA (以下、ヒトPJ01256全長cDNA) は、配列番号2に記載したヒト脳由来cDNAクローンPJ01256の塩基配列から特異的に作製したプライマーあるいはプローブを用いて、5' RACE (Rapid amplification of

20 cDNA end) 法あるいはライブラリスクリーニング法等を行なうことで取得できる。ここでは、5' RACE法によるヒトPJ01256全長cDNAの取得を記述する。

- (1) まず、ヒト脳由来cDNAクローンPJ01256特異的に合成したmRNAに対しアンチセンス方向の2本のプライマー (例えば以下のPJ-A01・PJ-A03等) と、鋳型cDNAに連結させたアダプター配列特異的な2本の
- 25 プライマー (例えば以下のAP1・AP2等) を組み合わせて用い、一般的に行われているように2回のPCRを行なう。

PJ-A01; 5'-CATGTCCTTGAGGTCACCCAG-3'  
 PJ-A03; 5'-TCAGACCTACAATTGCAATG-3'  
 AP1 ; 5'-CCATCCTAATACGACTCACTA  
 TAGGGC-3'  
 5 AP2 ; 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'

鋳型cDNAには、例えば市販の「Marathon-Ready™ cDNA Human Ovary; 既知配列のアダプターが連結されたヒト卵巣由来二本鎖cDNA、Clontech社製」等を用いることが可能である。あるいはmRNAから、二本鎖cDNAを合成し、任意の配列からなるアダプターを連結したものも、鋳型cDNAとして使用できる。

5' RACE法で用いる耐熱性酵素は、例えば「KOD PLUS、東洋紡製」等を利用できる。「KOD PLUS」及び「Marathon-Ready™ cDNA Human Ovary」を用いた場合の第一次及び第二次PCRの条件を以下に記述する。

#### 第一次PCR反応液組成

	容量	試薬	終濃度
	5 $\mu$ l	Marathon-Ready™ cDNA	
20	27 $\mu$ l	蒸留水	
	5 $\mu$ l	10 $\times$ KOD PLUS バッファー	1 $\times$
	5 $\mu$ l	dNTP (各2mM)	0.2mM
	3 $\mu$ l	MgSO <sub>4</sub> (25mM)	1.5mM
	2 $\mu$ l	AP1プライマー (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M
25	2 $\mu$ l	PJ-A03 (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M
	1 $\mu$ l	KOD PLUS	
	計50 $\mu$ l		

## 第一次PCR運転プログラム

	98°C, 2分/1サイクル	
	98°C, 20秒	} 30サイクル
	60°C, 20秒	
5	75°C, 2分	
	75°C, 10分/1サイクル	

## 第二次PCR反応液組成

	容量	試薬	終濃度
10	2 $\mu$ l	第一次PCR産物	
	62 $\mu$ l	蒸留水	
	10 $\mu$ l	10 $\times$ KOD PLUS バッファー	1 $\times$
	10 $\mu$ l	dNTP (各2mM)	0.2mM
	6 $\mu$ l	MgSO <sub>4</sub> (25mM)	1.5mM
15	4 $\mu$ l	AP2プライマー (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M
	4 $\mu$ l	PJ-A01 (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M
	2 $\mu$ l	KOD PLUS	
	計100 $\mu$ l		

## 20 第二次PCR運転プログラム

	98°C, 2分/1サイクル	
	98°C, 20秒	} 30サイクル
	60°C, 20秒	
	75°C, 2分	
25	75°C, 10分/1サイクル	

5' RACE産物は、例えば「Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit、Invitrogen社製」等を用いて、プラスミドベクター（「Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit」の場合にはpCR™-BluntII-TOPO）に連結し、大腸菌コンピ  
5 テントセルに形質導入することで、5' RACE産物を含むプラスミドベクターを有する大腸菌形質転換体としてクローン化できる。5' RACE産物を分子量で分画する場合には、アガロース電気泳動後、DNAのバンドをゲルから切り出し、例えば「QIA Quick Gel Extraction Kit、QIAGEN社製」等を用いて回収することで分画し、上記の方法で同様にクロー  
10 ン化できる。

クローン化した5' RACE産物は、使用したプラスミドベクターに適応した抗生物質（pCR™-BluntII-TOPOの場合には、「硫酸カナマイシン、ナカライテスク社製等」）を含む大腸菌生育培地（例えばTerrific Broth等）で大腸菌形質転換体を培養し、プラスミドを、例えば「QIAprep™ Spin Miniprep Kit、QIAGEN社製」等で抽出すること  
15 ことで得られる。

5' RACE産物の塩基配列データは、鋳型として抽出したプラスミド、使用したプラスミドベクターに適応したプライマー（pCR™-BluntII-TOPOの場合には、SP6プライマー、T7プライマー等）、必要に応じてPJ01  
20 256特異的プライマー（PJ-A01等）を用い、「BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit、PE Biosystems社製」等にて調製したサンプルを、電気泳動式塩基配列解析装置（サンプル調製に「BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit」を用いた場合には「ABI PRISM™ 310 ジェネ  
25 ティックアナライザ、PE Biosystems社製」等）で解析することにより得られる。得られた塩基配列データを、シーケンスアセンブリソフト（例

例えば「Sequencher 3.1、Gene Codes社製」等を用いて連結することで、クローンごとの塩基配列が得られる。

ヒトPJ01256全長cDNAの塩基配列は、上記5' RACE産物のクローンごとの塩基配列と実施例1に記載したヒト脳由来cDNAクローンPJ01256の塩基配列（配列番号2）を、互いのオーバーラップを5' RACEに使用したプライマー以外の部分で確認した後、連結することで得られる。

(2)ヒトPJ01256全アミノ酸コード領域の塩基配列を明らかにするため、ヒト脳由来cDNAクローンPJ01256塩基配列（配列番号2）特異的に合成した上記プライマー（AP1、AP2、PJ-A01、及びPJ-A03）を用いて5' RACE法を行なった。

5' RACEの鋳型cDNAには、市販の「Marathon-Ready™ cDNA Human Ovary；既知配列のアダプターが連結されたヒト卵巣由来二本鎖cDNA、クロンテック社製、Code No. 7417-1」を用いた。PCR用耐熱性酵素には「KOD PLUS、東洋紡製」を用い、以下の条件で第一次PCRを行なった。

第一次PCR反応液組成は、上記のものと同一である。

#### 第一次PCR運転プログラム

20      98℃, 2分／1サイクル  
         98℃, 10秒  
         60℃, 10秒      } 30サイクル  
         75℃, 2分  
         75℃, 10分／1サイクル

25

第一次PCR反応終了後、脱塩及び脱プライマーするため、反応液を「Suprec-02、宝酒造製」を用いて精製した。精製したPCR産物は100μl

(50  $\mu$ l  $\times$  2回) のTE緩衝液で回収し、以下の第二次PCRの鋳型として用いた。

第二次PCR反応液組成は、上記のものと同一である。

5

#### 第二次PCR運転プログラム

	98°C, 2分/1サイクル	
	98°C, 10秒	} 30サイクル
	60°C, 10秒	
10	75°C, 2分	
	75°C, 10分/1サイクル	

5' RACE産物は、常法に従いプラスミドベクターに連結し、大腸菌形質転換体としてクローン化した後、プラスミドを抽出し塩基配列を決定した。得られた5' RACE産物の塩基配列から、上記と同様に、特異的プライマーを作製して5' RACE法を繰り返すことにより、ヒトPJ01256全長cDNA塩基配列(配列番号3)を得た。

ヒトPJ01256全長cDNA塩基配列(配列番号3)は、総塩基数がポリA(polyA)配列を除いて5,610であり、3,672塩基からなるアミノ酸コード領域(配列番号3の770-4,441番目)を有していた。該領域にコードされるアミノ酸配列を配列番号4に示す。また、5'非翻訳領域上にアミノ酸コード領域と同一フレーム上の終止コドンが2箇所(配列番号3の206-208番目;TAG、275-277番目;TGA)、3'非翻訳領域上にポリA付加シグナルが1箇所(配列番号3の5,586-5;591番目;AATAA)存在した。

Marathon-Ready™ cDNA Human Ovaryを鋳型として、アミノ酸コード領域を再度クローニングしたところ、2つの対立遺伝

子がそれぞれ得られ、両者の比較で3箇所のSNPsが確認された(表1のSNPs 1~3)。そのうち2つのSNPsはアミノ酸置換を伴っていた(表1のSNPs 2及び3)。また、ヒト脳由来PJ01256 cDNAクローン(配列番号2)との比較では2箇所のSNPsが確認され(表1のSNPs 4及び5)、  
 5 うち1つのSNPsはアミノ酸置換を伴っていた(表1のSNPs 4)。

表1

	SNPs	cDNA 配列 (配列番号 3)			アミノ酸配列 (配列番号 4)	
		位置	塩基	コドン	位置	アミノ酸
10	1	821	C, T	<u>CTG</u> , <u>TTG</u>	18	Leu
	2	1,079	C, T	<u>CCC</u> , <u>TCC</u>	104	Pro, Ser
	3	1,097	A, G	<u>ATG</u> , <u>GTG</u>	110	Met, Val
	4	1,620	C, A	<u>TCC</u> , <u>TAC</u>	284	Ser, Tyr
	5	2,119	T, C	TGT, TGC	450	Cys

15

## 実施例3

(ヒトPJ01256 遺伝子発現ベクター作製)

ヒトPJ01256のC末端にMycHisタグ配列が融合されたものを発現する哺乳動物細胞用発現ベクターの作製は、以下のような操作で行なうことができる。  
 20 ける。

まず、ヒトPJ01256の終始コドンを除く全アミノ酸コード領域の両端にアニーリングするPCRプライマーペアを設計する。上流側プライマーには、ヒトPJ01256 cDNAの開始コドン(ATG)の5'上流側に発現用ベクター(例えば、Invitrogen社製pcDNA3.1(-)/MycHis  
 25 A)のマルチクローニングサイトに存在する制限酵素部位(例えば、NheIあるいはNotI等)を付加して設計し、下流側プライマーにはヒトPJ01256 cDNAがコードするC末端アミノ酸(ロイシン)コドンの下流に、同じく発

現ベクターのマルチクローニングサイトに存在する制限酵素部位（例えばHindⅢあるいはKpnⅠ等）を付加して設計する。なお、選択する制限酵素は可能な限りヒトPJ01256 cDNAの全アミノ酸コード領域に認識部位が存在しない制限酵素を用いる。また制限酵素を用いたDNA断片の挿入により生じる

5 アミノ酸フレームのずれを考慮してプライマーを設計する。例えばpcDNA3.1（-）/MycHisAの場合には、下流側に設定する制限酵素は、発現ベクターと連結した際にMycHis領域とフレームが合うよう塩基の数を調整して設計する。以上のように設計したプライマーを用い、ヒトPJ01256 cDNA断片を含むプラスミドを鋳型として、耐熱性DNAポリメラーゼKOD PLUS（東洋紡）等でPCR反応を行ない、発現ベクターに挿入可能な制限酵素部位を有する全長cDNA断片を取得できる。

適当な哺乳動物細胞発現用ベクター（例えば、pcDNA3.1（-）/MycHisA、Invitrogen社製）及び増幅した全長ヒトPJ01256 cDNAを、プライマーに付加した制限酵素で消化した後、アガロースゲル電気

15 泳動し、それぞれ目的のDNA断片を、例えばQIA Quick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）等を用いてアガロースゲル中から回収する。ゲル中から回収した全長ヒトPJ01256 cDNA及びpcDNA3.1（-）/MycHisA断片は、例えばReady-To-Go T4 DNA ligase（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）を用

20 いて連結できる。連結したプラスミドを大腸菌コンピテントセル（例えば、DH5αコンピテント細胞、東洋紡製）に導入し、形質転換体を得る。得られた大腸菌形質転換体は、用いた発現ベクターの選択マーカー（例えばアンピシリン等）を含むTerrific Broth培地等で培養し、当該DNAを含むプラスミドをQIAprep™ Spin Miniprep Kit（QIAGEN社製）等の市販のDNA抽出キットで精製できる。

25

作製したプラスミドのDNA塩基配列は以下のようにして確認できる。発現ベクター由来の配列から設計したプライマー（例えば、pcDNA3.1（-）／

- My c H i s Aを用いた場合には、p c D N A - S 1 : C A C T G C T T A C T  
 G G C T T A T C G 及び p c D N A - A 1 : A C T A G A A G G C A C A G T C  
 G A G G 等のプライマー) と、ヒト P J 0 1 2 5 6 c D N A 配列上で約 3 0 0 b  
 p 程度ごとに適当なプライマーを設計し、例えば、「BigDye Termin  
 5 ator Cycle Sequencing FS Ready React  
 ion Kit」(PE Biosystems社製)等の塩基配列決定用サンプ  
 ル調製試薬を用いて、抽出したプラスミドの塩基配列決定用サンプルを調製する。  
 サンプル調製に「BigDye Terminator Cycle Sequ  
 encing FS Ready Reaction Kit」を用いた場合に  
 10 は、キャピラリー電気泳動式塩基配列解析装置ABI PRISM™ 310  
 ジェネティックアナライザ (PE Biosystems社製) 等で解析する。  
 得られた塩基配列データは、例えばSequencher 3.1 (Gene C  
 odes社製) 等のシーケンスアセンブリソフトを用いて1本に連結し、作  
 製したプラスミドのDNA塩基配列を得る。
- 15 このようにして得られたプラスミドのDNA塩基配列から目的の塩基配列を有  
 するプラスミドを選択して、ヒト P J 0 1 2 5 6 発現ベクターを作製できる。

#### 実施例 4.

(ヒト P J 0 1 2 5 6 遺伝子発現ベクター作製)

- 20 ヒト全長 P J 0 1 2 5 6 の C 末端に H i s タグ配列を融合発現する哺乳動物細  
 胞用発現ベクターを作製するため、以下のプライマーを合成した (アマシャム・  
 ファルマシア・バイオテック社に発注)。

25 B H P J - S 0 1 ; 5 ' - G A A A G G A T C C C G G A G C G C T C  
 C T G G A T G A A G - 3 '  
 H D P J - A 0 1 ; 5 ' - G A A A A A G C T T C A A G T T G G A C  
 T T A G A G C A A G - 3 '

なお、BHPJ-S01は、制限酵素消化のためのスパーサー（4塩基；GAAA）、制限酵素BamHIの認識配列（6塩基；GGATCC）、ヒトPJ01256 cDNAへのアニーリング配列（20塩基；CGGAGCGCTCCTGGATGAAG：配列番号3の756-775番目に完全一致）から成る。また、

5 HDPJ-A01は、制限酵素消化のためのスパーサー（4塩基；GAAA）、制限酵素HindIIIの認識配列6塩基AAGCTT）、ヒトPJ01256 cDNAへのアニーリング配列（20塩基；CAAGTTGGACTTAGAGCAAG：配列番号3の4, 422-4, 441番目の相補鎖に完全一致）から成る。

BHPJ-S01及びHDPJ-A01をプライマーとして用い、PCR法によってヒトPJ01256全アミノ酸コード領域の増幅を試みた。鋳型cDNAは、市販の「Marathon-Ready™ cDNA Human Ovary；既知配列のアダプターが連結されたヒト卵巣由来二本鎖cDNA、Clontech社製、CodeNo. 7417-1」を用いた。PCR用耐熱性酵素には「KOD PLUS、東洋紡製」を用い、以下の条件でPCRを行なった。

15

## PCR反応液組成

	容量	試薬	終濃度
	2 $\mu$ l	Marathon-Ready™ cDNA	
	58 $\mu$ l	蒸留水	
20	10 $\mu$ l	10 $\times$ KOD PLUS バッファー	1 $\times$
	20 $\mu$ l	dNTP（各2mM）	0.4mM
	6 $\mu$ l	MgSO <sub>4</sub> （25mM）	1.5mM
	1 $\mu$ l	BHPJ-S01（50 $\mu$ M）	0.5 $\mu$ M
	1 $\mu$ l	HDPJ-A01（50 $\mu$ M）	0.5 $\mu$ M
25	2 $\mu$ l	KOD PLUS	
	計100 $\mu$ l		

## PCR運転プログラム

98°C, 3分/1サイクル  
 98°C, 20秒 }  
 60°C, 20秒 } 40サイクル  
 5 75°C, 5分 }  
 75°C, 10分/1サイクル

得られた約3.7KbpのPCR産物は、常法に従いプラスミドベクターに連結して大腸菌形質転換体としてクローン化した後、プラスミドを抽出し、塩基配列を決定した。その結果、約3.7KbpのPCR産物は目的のPCR産物（ス  
 10 ペーサー—BamHI認識配列—配列番号3の756～4,441—HindIII認識配列—スパーサー）であった。

哺乳動物細胞発現用ベクターはpCMH01（図1のA；市販の「pcDNA  
 3.1（-）/MycHisA、Invitrogen社製」のBGHポリA配  
 15 列をチミジンキナーゼ（TK）ポリA配列に置換したもの）を用いた。すなわち、  
 pcDNA3.1（-）/MycHisAの、BGHポリA配列（[http://www.invitrogen.com/vecseq\\_gcg/pcdna3.1mychisa.seq](http://www.invitrogen.com/vecseq_gcg/pcdna3.1mychisa.seq)に提示されている塩基配列の1,116～1,343番目）は、その両側に認識サイトを有する制限酵素AflII（認識サイト；  
 20 CTTAAG、同配列の1,090～1,095番目）及びPvuII（認識サイト；CAGCTG；同配列の1,363～1,368番目）で消化することで除いた。TKポリA配列は「pREP10、Invitrogen社製」を鋳型として、プライマーペア（GAAACTTAAGGGGAGATGGGGGAGGCTAAC及びGGCCCACCCAGACCCACGCAAC）でPCR法に  
 25 より増幅したものをAflIIで消化することで調製した。BGHポリA配列を除いたpcDNA3.1（-）/MycHisA及びTKポリA配列は、常法に従い連結した後、大腸菌形質転換体としてクローン化し、プラスミドを抽出して塩

基配列を確認した。

得られたヒトPJ01256 cDNAクローン及び哺乳動物細胞発現用ベクターpCMH01は、BamHI及びHindIIIで消化し、常法に従い連結した。作製したプラスミドpCMH01-PJ01256は大腸菌形質転換体としてク  
5 ローン化した後、プラスミドを抽出して塩基配列を決定し、ヒトPJ01256 cDNA下流にMyHisタグ配列が同一フレームで連結されたことを確認した(図1のB)。

#### 実施例5

##### 10 (ヒトPJ01256の哺乳動物細胞での発現)

ヒトPJ01256の哺乳動物細胞での発現を確認するため、実施例4で作製した哺乳動物細胞用発現ベクターpCMH01-PJ01256を用いて、以下の検討を行った。

φ10cm組織培養用ディッシュ「Falcon 3001、ベクトン・ディ  
15 ッキンソン社製」上に約50%コンフルント(confluent)に付着生育させたCOS7細胞に対し、1ディッシュあたり10μgのpCMH01-PJ01256を遺伝子導入した。対照としては1ディッシュあたり10μgのpCMH01を用いた。遺伝子導入は市販の「LipofectAMINE PLUS、Lifetechnologies社製」を用い、添付プロトコルに従って  
20 行った。

遺伝子導入48時間後、細胞を回収し、100μlの細胞溶解液(20mM Tris-HCl pH7.4、10% グリセロール、1% Triton X-100、0.1% SDS)で溶解させた。100μlのSDS電気泳動用緩衝液(100mM Tris-HCl pH6.8、20% グリセロール、  
25 12% 2-メルカプトエタノール、4% SDS、プロモフェノールブルーで着色)を加えた後、100℃で2分間加熱したものをサンプルとして、ウェスタンブロッティング解析を行った。各サンプル0.2mlのうち30μlをSDS

ーボリアクリルアミド電気泳動に供した。SDSーボリアクリルアミド電気泳動は、市販の「マルチゲル4／20、第一化学薬品社製」を「カセット電気泳動槽「第一」DPE-120」にセットし、40mA定電流で1時間行った。泳動用緩衝液は、「Tris-Glycine-SDS・Powder、宝酒造製」を用い、分子量マーカーは、「6×His Protein Ladder、QIAGEN社製」を用いた。泳動終了後、「ミニトランスブロット、BIO-RAD社製」を用いて、エレクトロトランスファー(Electro Transfer)によりPVDFメンブレン「TEFCO社製、Code. No. 03-056」にブロッティングした。エレクトロトランスファーは、「Tris-Glycine Powder、宝酒造製」にメタノールを20%添加した緩衝液中で、150mA定電流で1.5時間行った。ブロッティングしたPVDFメンブレンは、「Penta His Antibody HRP Conjugate、QIAGEN社製」を用い、添付されていたプロトコルに従って抗体反応を行った。抗体にラベルされたホースラディッシュ・パーオキシダーゼ(Horseradish peroxidase)の検出には「ECL Plus、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製」を用い、添付されていた標準プロトコルに従って行った。結果を図2に示した。

図2に示したように、pCMH01-PJ01256を導入したCOS7細胞では分子量100kDa以上のタンパク質のシグナル(図2の矢印)が確認された。対照としたpCMH01では該当するシグナルは検出されなかった。以上の検討より、ヒトPJ01256タンパク質の発現が哺乳動物細胞系で確認された。

#### 実施例6

(ヒトPJ01256の発現組織解析)

(1) ヒトPJ01256遺伝子の発現組織を解析するため、下記のPCRプライマーを合成した。下記プライマーの組み合わせを用いてPCRにより、505bpのヒトPJ01256 cDNA断片が増幅された。

PJ-S09センスプライマー (sense primer);

5' -GGAAAGGCCATGAAATAAGG-3'

PJ-A12アンチセンスプライマー (antisense primer);

5' -GCTGACGTCTGCTATAATAG-3'

5

次に24種のヒト臓器のmRNAに由来するcDNAを4種の濃度で96ウェルプレート中に調製した「ヒトRAPID-SCAN™ GENE EXPRESSION PANEL」(OriGene Technologies, Inc.)を鋳型として、下記の酵素溶液(25 $\mu$ l/ウェル)を添加し、ミネラルオイルを適量(約25 $\mu$ L)重層した。

	容量	試薬	終濃度
	2.5 $\mu$ l	10 $\times$ Ex Taq バッファー	1 $\times$
	2.0 $\mu$ l	dNTP (各2.5mM)	0.2mM
15	1.0 $\mu$ l	10 $\mu$ M センスプライマー	0.4 $\mu$ M
	1.0 $\mu$ l	10 $\mu$ M アンチセンスプライマー	0.4 $\mu$ M
	18.25 $\mu$ l	蒸留水	
	0.25 $\mu$ l	Ex Taq ポリメラーゼ (5U/ $\mu$ l)	
			0.05U/ $\mu$ l
20	計25 $\mu$ l		

ミネラルオイルを重層後、プレートをプラスチックカバーシートで被い、15分間静置後、サーマルサイクラー(PCR Thermal Cycler MP:宝酒造)にセットし、以下のPCR運転プログラムで反応させた。

25

(以下余白)

- 94°C, 2分/1サイクル
- 94°C, 30秒 }  
 60°C, 30秒 } 35サイクル  
 72°C, 30秒 }
- 5 72°C, 10分/1サイクル

PCR反応終了後、PCR産物5 $\mu$ Lを1 $\mu$ Lの10 $\times$ 泳動用緩衝液（宝酒造の制限酵素に添付）と混合し、Mupid電気泳動槽（コスモバイオ）にセットした2%アガロースゲル（SeaKem GTG agarose: FMC BioProducts）に供し、トリス-ホウ酸緩衝液（宝酒造製）下、100Vの定電圧で約45分間泳動した。泳動後、500ng/mLの臭化エチジウム溶液で染色し、紫外線照射下で泳動像を観察した。その結果を図3に示す。

図3に示した結果から、ヒトPJ01256遺伝子は、特に卵巣で発現が高く、ついで腎臓、肺、胃、精巣、副腎、脾臓で、発現量が高かった。脳、小腸、骨格筋、皮膚で中程度に発現しており、心臓、大腸、胎盤、前立腺では弱い発現が観察された。脾臓、肝臓、唾液腺、甲状腺、子宮、白血球、骨髄では、ほとんど発現が観察されなかった。また、胎児組織については、脳で中程度に発現しており、肝臓では弱い発現が観察された。

(2) さらに、ノーザンハイブリダイゼーションにより、ヒトPJ01256遺伝子の発現組織分布及びmRNAの解析を行った。プローブは、ヒトPJ01256 cDNAのKpnI/StuI消化断片（663bp）をアガロースゲル電気泳動法により分離・精製したものをを用いた。プローブDNAのラベリングは、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製の「DNA Labelling Beads (-dCTP)、Cat. No. 27-9240-01」と、「<sup>32</sup>P-dCTP、Cat. No. PB10205」を用いて行った。DNAに取り込まれなかった<sup>32</sup>P-dCTPの除去は、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製の「Probe Quant™ G-50 Micro Columns、Ca

t. No. 27-5335-01」により行った。各種組織由来mRNAをプロットしたフィルターは、クロンテック社より購入したHuman MTN Blot (Cat. No. 7760-1)、Human MTN Blot II (Cat. No. 7759-1)、Human MTN Blot III (Cat. No. 7767-1) を用い、ハイブリダイゼーションの条件はクロンテック社のプロトコルに従って行った (図4)。

図4のA. に示した結果から、ヒトPJ01256遺伝子は卵巣において特異的に発現しており、次いで腎臓及び脾臓で弱く発現していることが示された。またmRNAの大きさは約5.5Kbで、全長cDNAの大きさと一致しており、  
10 明瞭なスプライシングバリエーションは検出されなかった。また、5'末端側のDNA断片 (Sac II/Sal I断片、746bp) をプローブとして用いた場合も上記と同様の結果が得られた。さらに長期間の露光により得られた結果 (図4のB.) から、脳、肝臓、精巣、小腸、胃、副腎の各組織においてもわずかに発現していることが示された。また、図4のC. には、ノーザン解析の内部コントロールであるアクチン遺伝子のプロットの結果を示した。  
15

#### 実施例7

(ヒトPJ01256遺伝子のがん組織における発現解析)

PJ01256遺伝子と病態との関与を解析することを目的として、ヒトの腫瘍組織における発現量と正常組織における発現量とを比較検討した。PCR増幅用のプライマーとしては、実施例6で用いたPJ-S09 (センスプライマー) 及びPJ-A12 (アンチセンスプライマー) を使用した。このプライマーセットによりPCRで505bpのヒトPJ01256cDNA断片が増幅された。コントロール遺伝子としてはグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (G3PDH) を用い、PCR増幅用のプライマーとしては、市販のプライマーセット (クロンテック社製, Code. No. 5405-1) を用いた。こ  
20  
25

のプライマーセットによりPCRで452bpのG3PDH cDNA断片が増幅された。

ヒト腫瘍組織及び正常組織（卵巣、脳、及び副腎）由来cDNAは、BioC  
hain Institute (Hayward, CA, USA) より購入した、  
5 「Human Adult Tumor Ovary cDNA (Adenocarcinoma)、Code. No. 0540016、Lot. No. A301017」及び「Human Adult Normal Ovary cDNA、Code. No. 0510037、Lot. No. A303212」、「Human Brain Tumor cDNA (Meningioma)、Code. No. 0540004、Lot. No. A304007」及び「Human Adult Normal Brain cDNA、Code. No. 0510005、Lot. No. A301089」、「Human Adult Tumor Adrenal cDNA (Adenocarcinoma)、Code. No. 0540001、Lot. No. A212030」及び「Human Adult Normal Adrenal cDNA、Code. No. 0510001、Lot. No. A206095」を用いた。それぞれのcDNA原液をTE溶液（10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0）で10倍希釈した後、さらに1/2倍希釈操作を順次7回繰り返して、濃度が1倍、1/2倍、  
10 (1/2)<sup>2</sup>倍、(1/2)<sup>3</sup>倍、(1/2)<sup>4</sup>倍、(1/2)<sup>5</sup>倍、(1/2)<sup>6</sup>倍、  
20 (1/2)<sup>7</sup>倍の希釈系列を作製し、各溶液5μlを鋳型cDNAとした。PCR反応は、宝酒造の「TaKaRa Ex Taq™、CodeNo. RR001A」を用いて下記の条件で行った。

(以下余白)

## PJ01256増幅用反応液組成

	容量	試薬	終濃度
	5.0 $\mu$ l	10 $\times$ Ex Taq バッファー	1 $\times$
	4.0 $\mu$ l	dNTP (各2.5mM)	0.2mM
5	0.2 $\mu$ l	PJ-S09 (50 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M
	0.2 $\mu$ l	PJ-A12 (50 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M
	35.35 $\mu$ l	蒸留水	
	25 $\mu$ l	Ex Taq ポリメラーゼ (5U/ $\mu$ l)	
			0.025U/ $\mu$ l
10	計45 $\mu$ l		

## G3PDH増幅用反応液組成

	容量	試薬	終濃度
	5.0 $\mu$ l	10 $\times$ Ex Taq バッファー	1 $\times$
15	4.0 $\mu$ l	dNTP (各2.5mM)	0.2mM
	0.1 $\mu$ l	GPDHS2 (100 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M
	0.1 $\mu$ l	GPDHA2 (100 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M
	35.55 $\mu$ l	蒸留水	
	0.25 $\mu$ l	Ex Taq ポリメラーゼ (5U/ $\mu$ l)	
20			0.025U/ $\mu$ l
	計45 $\mu$ l		

PCRチューブに各cDNA溶液を分注し、上記の酵素／プライマー溶液を添加後、サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler MP: 宝酒造製) にセットし、以下のPCR運転プログラムで反応させた。

## PCR運転プログラム

- 94℃, 2分/1サイクル
- 94℃, 30秒
- 60℃, 30秒
- 72℃, 30秒
- 72℃, 10分/1サイクル
- 25サイクル (G3PDHのとき)
- 又は35サイクル (PJ01256のとき)

- PCR反応終了後、PCR産物10 $\mu$ Lを1 $\mu$ Lの10 $\times$ 泳動用緩衝液（宝酒造の制限酵素に添付）と混合し、Mupid電気泳動槽（コスモバイオ：東京）にセットした2%アガロースゲル（SeaKem GTG agarose: FMC BioProducts, Rockland, ME, USA）に供し、トリス-ホウ酸緩衝液（宝酒造製）下、100Vの定電圧で約45分間泳動した。泳動後、アガロースゲルを500ng/mLの臭化エチジウム溶液で染色し、紫外線照射下で泳動像を観察してPJ01256遺伝子及びG3PDH遺伝子の発現量をPCR産物の濃度として可視的に判定した。その結果を図5（卵巣）、図6（脳）及び図7（副腎）に示す。

- その結果、図5、6、及び7に示したように、いずれの組織においてもG3PDH遺伝子の発現量は、正常組織と腫瘍組織においてほぼ同じ発現量であるのに対し、腫瘍組織ではPJ01256遺伝子の発現量が著しく低下（約1/32～1/64）していることが示された。この結果から、ヒトPJ01256遺伝子が卵巣、脳、副腎における腫瘍に関連する遺伝子であることが示唆された。

## 実施例8

- (PJ01256マウスカウンターパートの取得)

PJ01256のマウスカウンターパートを取得するため、ヒトPJ01256 cDNAのアミノ酸コード領域をクエリーとして公共データベースを検索した

ところ、2つのマウスゲノムDNA配列〔genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) のID AZ093080及びAZ119800〕がヒットした。AZ093080の塩基配列の146～242番目及びAZ119800の塩基配列の418～478番目が、それぞれヒトPJ01256全長cDNA配列（配列番号3）の2,373～2,470番目及び2,621～2,680番目に高い相同性を示した。両マウス配列の相同性の高かった部分から下記のプライマーを作製し、以下の検討に使用した。

mPJ-S02; 5'-GAAGGAAATGTGAGACCAAG-3'  
10 mPJ-A01; 5'-CTTGGTCTCACATTTTCCTTC-3'  
mPJ-A02; 5'-CATGTCCTGCCACACAGAG-3'  
mPJ-A03; 5'-AAACTTCCCTCCATGAGATG-3'

マウスcDNA断片取得のため、市販の「Marathon-Ready<sup>TM</sup>  
15 cDNA Mouse Testis; 既知配列のアダプターが連結されたマウス精巣由来二本鎖cDNA、クロンテック社製、CodeNo. 7455-1」を鋳型として、以下の条件でPCRを行なった。PCR用耐熱性酵素には「KOD Dash、東洋紡製」を用いた。

(以下余白)

20

25

## P C R反応液組成

	容量	試薬	終濃度
	5 $\mu$ l	Marathon-Ready <sup>TM</sup> cDNA	
	61.4 $\mu$ l	蒸留水	
5	10 $\mu$ l	10 $\times$ KOD Dash バッファー	1 $\times$
	20 $\mu$ l	dNTP (各2mM)	0.2mM
	0.8 $\mu$ l	mPJ-S02 (50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M
	0.8 $\mu$ l	mPJ-A03 (50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M
	2 $\mu$ l	KOD Dash	
10	計100 $\mu$ l		

## P C R運転プログラム

	98 $^{\circ}$ C, 3分/1サイクル	
15	98 $^{\circ}$ C, 20秒	40サイクル
	60 $^{\circ}$ C, 20秒	
	75 $^{\circ}$ C, 5分	
	75 $^{\circ}$ C, 10分/1サイクル	

その結果、約230bpのPCR産物が得られた。PCR産物は、常法に従い  
 20 プラスミドベクターに連結し、大腸菌形質転換体としてクローン化した後、プラスミドを抽出し塩基配列を決定した。

塩基配列決定の結果、得られたPCR産物は233bpであり、ヒトPJ01  
 256全長cDNA配列（配列番号3）の2,409～2,641番目に対して  
 DNAレベルで83.7%（195/233）、同部分の推定アミノ酸配列で93.  
 25 5%（72/77）の相同性を有していた。

引き続き同一鋳型cDNAを用いて5' RACE法を行った。PCR用耐熱性  
 酵素には「KOD PLUS、東洋紡製」を用い、以下の条件で第一次PCRを

行なった。

第一次PCR反応液組成

	容量	試薬	終濃度
5	5 $\mu$ l	Marathon-Ready™ cDNA	
	27 $\mu$ l	蒸留水	
	5 $\mu$ l	10 $\times$ KOD PLUS バッファー	1 $\times$
	5 $\mu$ l	dNTP (各2mM)	0.2mM
	3 $\mu$ l	MgSO <sub>4</sub> (25mM)	1.5mM
10	2 $\mu$ l	AP1プライマー (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M
	2 $\mu$ l	mPJ-A03 (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M
	1 $\mu$ l	KOD PLUS	
計50 $\mu$ l			

15 第一次PCR運転プログラム

98°C, 2分/1サイクル

98°C, 20秒

55°C, 20秒

75°C, 4分

30サイクル

20 75°C, 10分/1サイクル

第一次PCR反応終了後、脱塩及び脱プライマーするため、反応液を「Suprec-02、宝酒造製」を用いて精製した。精製したPCR産物は100  $\mu$ l (50  $\mu$ l  $\times$  2回) のTE緩衝液で回収し、以下の第二次PCRの鋳型として用

25 いた。

## 第二次PCR反応液組成

	容量	試薬	終濃度
	2 $\mu$ l	第一次PCR産物	
	62 $\mu$ l	蒸留水	
5	10 $\mu$ l	10 $\times$ KOD PLUS バッファー	1 $\times$
	10 $\mu$ l	dNTP (各2mM)	0.2mM
	6 $\mu$ l	MgSO <sub>4</sub> (25mM)	1.5mM
	4 $\mu$ l	AP2プライマー (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M
	4 $\mu$ l	mPJ-A01	
10		又はmPJ-A02 (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M
	2 $\mu$ l	KOD PLUS	
	計100 $\mu$ l		

## 第二次PCR運転プログラム

15	98 $^{\circ}$ C, 2分/1サイクル	
	98 $^{\circ}$ C, 20秒	} 30サイクル
	55 $^{\circ}$ C, 20秒	
	75 $^{\circ}$ C, 4分	
	75 $^{\circ}$ C, 10分/1サイクル	

20

5' RACE増幅産物は、常法に従いプラスミドベクターに連結し、大腸菌形質転換体としてクローン化した後、プラスミドを抽出し塩基配列を決定した。

5' RACE産物の塩基配列は、先のマウスPJ01256部分cDNA塩基配列とのオーバーラップを確認した後、連結した。その結果、得られたマウスPJ01256部分cDNA塩基配列 (配列番号5) は422bpであり、ヒトPJ01256全長cDNA配列 (配列番号3) の2,220~2,641番目に対してDNAレベルで85.3% (360/422) の相同性を有していた。ま

25

た、マウスPJ01256部分cDNA推定アミノ酸配列（配列番号6）は140残基であり、ヒトPJ01256全長cDNA推定アミノ酸配列（配列番号4）の485～624番目に95.0%（133/140）の相同性を有していた（図8）。

5

#### 実施例9

（ヒトPJ01256のホモロジー検索）

ヒト脳由来PJ01256 cDNAクローンのアミノ酸配列（配列番号1）を既知配列に対して解析プログラム（BLAST2.0）（Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.）を用いて検索したところ、表2（ヒトPJ01256のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラムBLAST2.0を用いて検索した結果で、E-valueが $e-40$ 以下のもの）に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。さらに、ヒトPJ01256全長アミノ酸配列（配列番号4）を既知配列に対して解析プログラム（BLAST2.1）（同上）を用いて検索したところ、表3（ヒトPJ01256の全長アミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラムBLAST2.1を用いて検索した結果で、E-valueが $e-140$ 以下のもの）に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。ヒトPJ01256はADAMTSファミリーと相同性を有するクローンであることが判明した。

25

表 2

ヒット Hit (ID)	E-value	相同性 %	説明
AF140675	e-139	39%	Homo sapiens zinc metalloprotease ADAMTS7
Z69360	e-134	31%	gene: "F25H8.3"; Caenorhabditis elegans cosmid F25H8
X96389	e-128	34%	B. taurus mRNA for procollagen I N- proteinase
AJ003125	e-128	34%	Homo sapiens mRNA for procollagen I-N proteinase
AB002364	e-127	33%	Human mRNA for KIAA0366 gene, partial cds.
AF140674	e-124	37%	Homo sapiens zinc metalloprotease ADAMTS6
AF149118	e-121	34%	Rattus norvegicus a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 (ADAMTS-1)
AB001735	e-119	37%	Mus musculus DNA for ADAMTS-1
AF060152	e-116	35%	Homo sapiens METH1 protein
AF142099	e-101	32%	Homo sapiens aggrecanase-2 (ADAMTS11)
AF060153	1e-97	32%	Homo sapiens METH2 protein (METH2)
AF140673	2e-97	32%	Mus musculus putative secreted metalloprotease ADAMTS5
AB014588	1e-96	36%	Homo sapiens mRNA for KIAA0688 protein
AF148213	1e-96	36%	Homo sapiens aggrecanase-1
AF109907	4e-95	37%	"hypothetical protein"; Homo sapiens S164 gene
U64857	8e-78	29%	gene "C37C3.6a"; Caenorhabditis elegans cosmid C37C3.
Z81086	9e-48	26%	gene "F53B6.2"; Caenorhabditis elegans cosmid F53B6.
AW643518	4e-64	58%	Xenopus laevis cDNA clone PBX0129F06 5', mRNA sequence.
AB011177	3e-47	34%	Homo sapiens mRNA for KIAA0605 protein,
U42846	3e-46	31%	gene "T19D2.1"; Caenorhabditis elegans cosmid T19D2.
Z50004	2e-45	28%	gene "C02B4.1"; Caenorhabditis elegans cosmid C02B4

表 3

ヒット (ID) (Hit)	E- value	同一性% (Identities)	説明 (Description)
AF163762	0.0	36%	zinc metalloendopeptidase : homo sapiens
AJ250725	0.0	36%	a disintegrin-like and metalloprotease : homo sapiens
Q9UKP4	e-153	35%	ADAM-TS 7 : homo sapiens
AB037733	e-152	32%	KIAA1312 : homo sapiens
XP_007573.1	e-152	37%	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-7 : homo sapiens
NP_064634.1	e-149	31%	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-9 : homo sapiens
NP_055059.1	e-144	32%	ADAM-TS 2 : homo sapiens
O15072	e-143	31%	ADAM-TS 3 : homo sapiens
P79331	e-143	33%	ADAM-TS 2 : bovine

## 実施例 10

(ヒトPJ01256の解析)

- 5 ヒトPJ01256全長アミノ酸配列(配列番号4)をクエリーとし、検索ツールPfam HMM Search(HMMPFAM)(Sonnhammer EL,Eddy SR,Birney E,Bateman A,Durbin Pfam:multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. Nucleic Acids Res.(1998)Jan1;26(1):320-322)を用いて検索した。HMMPFAMのアルゴリズムにはHMMER2.1 (<http://hmmerr.wustl.edu/>)を、データベースにはPFAM6.0 (<http://pfam.wustl.edu/>)を用いた。その結果、ヒトPJ01256はTSP1ドメイン(tsp\_1)、及びレプロリシン型亜鉛メタロプロテアーゼドメイン及びレプロリシンファミリーペプチド(Pep\_M12Bpropep)を有することが判明した(表4)。
- 10
- 15

表 4

ヒット (Hit)	スコア (Score)	推定 (Expect)	Q from	Q to	配列 (sequence)
Pep_M12B_ propep	68.0	2e-16	111	235	DLRTSSSLVAPGFIVQTLGKTGTSVQT LPPEDFCFYQGSLRSHRNSSVALSTCQG LSGMIRTEEADYFLRPLPSHLSWKIGRA AQGSSPSHVLTKRSTEPHAPGASEVLVT SRTWELAHQPLHS
Reprolysin	85.6	9.8e-22	292	495	VETLVVVDKMMQNHGHENITTYVLTIL NMVSALFKDGTIGGNINIAIVGLILLED EQPGLVISHHADTLSSFQWQSGLMGK DGTRHDHAILLTGLDICSWKNEPCDTLG FAPISGMCSKYRSCTINEDTGLGLAFTI AHESGHNFGMIHDGEGNMCKKSEGNIMS PTLAGRNGVFSWSPCSRQYLHKFLSTAQ AICLADQP
tsp_1	65.9	8.6e-16	590	640	SDWSSWSPCSRTCAGGVSHRSRLCTNPK PSHGGKFCEGSTRTLKLCNSQKC
tsp_1	9.8	0.052	931	986	WSVGNWSAGSRTCAGGGAQSRPVQCTRRV HYDSEPVPASLGPQAPSSRQACNSQSC
tsp_1	16.7	0.0083	990	1047	WSAGPWAECSHTCGKGWRKRAVACKSTN PSARAQLLPDAVCTSEPKPRMHEACLLQ RC
tsp_1	13.3	0.02	1055	1101	WLVSASQCSVTGERGTQKRFKCAEKY VSGKYRELASKKCSHLPKP
tsp_1	19.6	0.0038	1128	1180	GSWFASPWSQCTASCGGGVQTRSVQCLA GGRPASGCLLHQKPSASLACNTHFC

結果の見方：

Hit : 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score : この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

5 Expect : この値が0に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from : 推定されたドメインの開始位置。

Q to : 推定されたドメインの終了位置。

sequence : 推定されたドメインの配列。

(以下余白)

## 実施例 11

(マウスPJ01256カウンターパートのホモロジー検索)

マウスPJ01256のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (BLAST2.1) (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.) (ftp://ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/nr 2001年2月23日更新分) を用いて検索したところ、表5に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。マウスPJ01256はADAMTSファミリーと相同性を有するクローンであることが判明した。

15

(以下余白)

20

25

表 5

ヒット (ID) (Hit)	E-value	同一性% (Identities)	説明 (Description)
P97857	1e-30	45%	ADAM-TS 1 : mouse
D67076	1e-30	45%	secretory protein containing thrombospondin motifs : mouse
AF304446	5e-30	45%	ADAMTS-1 : Rattus norvegicus
AE003435	6e-30	43%	CG4096 gene product : Drosophila melanogaster
AF163762	1e-29	42%	zinc metalloendopeptidase : homo sapiens
AF170084	7e-29	44%	metalloproteinase with thrombospondin type1 motifs ADAMTS1 : Homo sapiens
AL162080	9e-29	44%	hypothetical protein : Homo sapiens
AB037767	9e-29	44%	KIAA1346 protein : Homo sapiens
Q9R001	1e-25	41%	ADAM-TS 5 : mouse
XP_007573.1	1e-25	38%	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-7: homo sapiens
AF317415	1e-25	41%	aggrecanase-2 : Oryctolagus cuniculus
Q9TT92	4e-25	40%	ADAM-TS 5 : Bos taurus
XP_009712.1	4e-25	40%	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-5 preproprotein : Homo sapiens
T21371	2e-24	39%	hypothetical protein F25H8.3 : Caenorhabditis elegans
AF261918	4e-23	38%	disintegrin metalloproteinase with thrombospondin repeats : Homo sapiens
AB037733	4e-23	38%	KIAA1312 protein : Homo sapiens
XP_006240.1	5e-23	39%	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-8 preproprotein : Homo sapiens
075173	7e-23	41%	ADAM-TS 4 : homo sapiens
AB042272	1e-22	41%	ADAMTS-4 : Rattus norvegicus
AE003709	1e-22	38%	CG6107 gene product : Drosophila melanogaster
015072	3e-21	38%	ADAM-TS 3 : homo sapiens

## 実施例 1 2

(マウスPJ01256カウンターパートの解析)

- 5 マウスPJ01256のアミノ酸配列をクエリーとし、HMMPFAM (HMER2.1、PFAM6.0) (<http://hmmer.wustl.edu>)

u/) (<http://pfam.wustl.edu/>)を用いて実施例10と同様に検索した。その結果、マウスPJ01256はTSP1ドメイン(tsp\_1)を有することが判明した(表6)。

5 表6

ヒット (Hit)	スコア (Score)	推定 (Expect)	Q from	Q to	配列 (sequence)
Tsp_1	9.7	0.052	106	140	SDWSPWSPCSRTC GGGI SHRDRLCTNPRPSHG GKF

結果の見方：

- Hit : 検索の結果推定されるドメインの名前。
- Score : この値が高ければ高いほど信頼度が高い。
- Expext : この値が0に近ければ近いほど信頼度が高い。
- 10 Q from : 推定されたドメインの開始位置。
- Q to : 推定されたドメインの終了位置。
- sequence : 推定されたドメインの配列。

### 実施例13

- 15 (ヒト及びマウスPJ01256とADAMTSファミリーのアライメント)
- Clustalw1.81 (Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence Alignment through
- 20 sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680.)を用いてヒト及びマウスPJ01256と既知のADAMTSファミリーとのアミノ酸配列のアライメントを行なった(表7～表31)。表7～表3

1は、ヒト及びマウスPJ01256と既知のADAMTSファミリー遺伝子の  
アミノ酸配列を、N末端側からC末端側までアライメントした一連の表である。  
表中、「\*」はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。ま  
た、「:」はその位置で、{STA}、{NEQK}、{NHQK}、{NDBQ}、{Q  
5 HRK}、{MILV}、{MILF}、{HY}、{FYW} のようなグループのうち  
のいずれかが保存されている事を意味する。さらに、「.」はその位置で{CSA}、  
{ATV}、{SAG}、{STNK}、{STPA}、{SGND}、{SNDEQK}  
{NDEQHK}、{NEQHRK} のようなグループのうちのいずれかが保存さ  
れている事を意味する。ADAMTSファミリーは、TSP1ドメイン、zin  
10 c metalloproteaseドメイン及びCysteine-rich  
region (disintegrin-like) からなることが知られてお  
り(M. D. Tortorella, et al., Science (1999)  
284:1664-1666; F. Vazquez et al, J. Bio  
l. Chem. (1999) 274:23349-23357)、アライメントの  
15 結果から、303から376番目のアミノ酸(太字、#で印をつけた部分)はデ  
イスインテグリン様領域(disintegrin-like region)  
であることが判明した。この結果得られたドメインと実施例10又は実施例12  
にて同定したドメインを、ヒトPJ01256については表32に、マウスPJ  
01256については表33にまとめた。

表 7

	ADAMTS1	-----MGNAERAPGSR-----SFG-----PVPT-----LLL
	ADAMTS4	-----MSQTGSHPGRG-----LAGRWLWGAQPCLLLPVPLSWLWLLL
	ADAMTS8	-----MFPAPAAPRWL-----PFL-----LLL
5	ADAMTS5	-----MLLGWASLLLC-----AFR-----LPLAAVGPAATPAQDK
	ADAMTS9	-----MGFVSWATLLTL-----LVRDLAENGSPDAAA VRKDR LHPRQVK
	humanPJ01256	-----MKPRARGWRGLAALWMLLAGVAEQAPACAMG-----PAAA
	mousePJ01256	-----
	ADAMTS6	-----MEILWKTLTWILS-----LIMA
10	ADAMTS7	-----MPGGPSPRSPAPLLRP-----LLLL
	ADAMTS2	MDPPAGAARRLLCPALLLLLLLLPPLLPPPPPPA-----NARL
	ADAMTS3	-----SLWLIAAALVEVRTSADGQAG-----NEEM

15 表 8

	ADAMTS1	LAAAL-----LAVSDALGRPSE-----EDEELVPELER-----APGHGTTR-----
	ADAMTS4	LLLAS-----LLPSARLASPLP-----REEEIVFPEKLNQSVLPQSGAPARLL-----
	ADAMTS8	LLLLL-----PLARGAPARPAAG-----GQASELVVPTRLP-----GSAGELA-----
	ADAMTS5	AGQPP-----TAAAAAQPRRRQG-----EEVQERAEPGHPHPLAQRRRSKGLVQNIDQ
20	ADAMTS9	LLETLG EYEIVSPIRVNALGEPFPTNVHFKRTRRSINSATDPWPAFASSSSSSTSS-----
	humanPJ01256	APGSPSVPRPPPPAERPGWMEKGEYDLVSAYEVDHRGDYVSHEIMHHQRRRRRAVAVSEVE
	mousePJ01256	-----
	ADAMTS6	SSEFHS DHRLSYSSQEEFLTYLEHYQLTIPIRVDQNGAFLSFTVKN DKHSRRRRSMDPID
	ADAMTS7	LCALAPGAPG-----PAPGRATEGRAALDIVHPVRVDAGGSFLSYELWPRALRKRDVSVRRDA
25	ADAMTS2	AAAADPPGGPLGHGAERILAVPVRTDAQGRLVSHVSAATS RAGVRARRAAPVRTSPSPG
	ADAMTS3	VQIDLP-----IKRYREYELVTPVSTNLEGRYLSHTLSASHKKRSARDVSSNPE-----

表 9

	ADAMTS1	—LRLHAFDQQLDLELRPDSSFLAPGFTLQNVGR—KSG
	ADAMTS4	—CRLQAFGETLLELEQDSGVQVEGLTVQYL—
	ADAMTS8	—LHLSAFGKGFLRLAPDDSLAPEFKIERLG—GS
5	ADAMTS5	LYSG—GGKVGYL VYAGGRRFLDLERDGSVG I AGFVPAGGG—
	ADAMTS9	—QAHYRLSAFGQQFLFNL TANAGF I APLFTVTLLGT—PGV
	humanPJ01256	S—LHLRLKGSRHDFHVDLRTSSSLVAPGFI VQTLG—
	mousePJ01256	—
	ADAMTS6	PQQA—VSKLFFKLSAYGKHFLNLTNTDFVSKHFTVEYWG—
10	ADAMTS7	P—AFYELQYRGRELRFNL TANQHLLAPGFVSETRR—
	ADAMTS2	GNEEPPGSHLFYNVTVFGRDLHLRLRPNARLVAPGATMEWQGE—
	ADAMTS3	—QLFFNI TAFGKDFHLRLKPNTQLVAPGAVVEWHETSLVPGNI TDPINNHPG

15 表 10

	ADAMTS1	SETPLPE—TDLAHC FYSGTVNG—DPSSAAALSLCEG—VRGAFYLLGEAYFIQPLPAA
	ADAMTS4	QAPELLG—GAEPGYLTGTING—DPESVASLHWDGGALLGVLYRGAELHLOPLEGG
	ADAMTS8	GRATGGE—RGLRGCFSGTVNG—EPESLAAVSLCRG—LSGSFLLDGEEFTIQPQGAG
	ADAMTS5	—TSAPW—RHRSHCFYRGTVDA—SPRSLAVFDLCGG—LDGFFAVKHARYTLKPLL RG
20	ADAMTS9	NQTKFYSEEEAELKHCFYKGYVNT—NSEHTAVISLC SG—MLGTFRSHDGDYFIEPLQSM
	humanPJ01256	KTGKSVQTLPPEDFCFYQGS LRS—HRNSSVALSTCQG—LSGMI RTEEADYFLRPLPSH
	mousePJ01256	—
	ADAMTS6	KDGPQWKHDFLDN—CHYTG YLQD—QRSTTKVALSN CVG—LHGVIATEDEEYFIEPLKNT
	ADAMTS7	RGGLGRAH IRAHTPACHLLGEVDPELEGG LAAISACDG—LKG V FQLSNEDYFIEPLDSA
25	ADAMTS2	—KGTTRVEPLLGSCLYVGDVAG—LAEASSVALSN CDG—LAGLIRMEEEFFIEPLEKG
	ADAMTS3	SATYRIRKTEPLQTNCAVVDI—IPGTS—VAISNCDG—LAGMIKSDNEEYFIEPLERG

表 1 1

	ADAMTS1	SERLATAAPGEKPPAPLQFHLLRRNRQGDVGGTCGVVDDEPRPT—GKAETEDEDEGTEG
	ADAMTS4	TP—NSAGGPG—AHILRRK—SPA
	ADAMTS8	GSLAQPHRLQRWGPAG—ARPLPRGPEWEVETG—EGQRQERGDHQ
5	ADAMTS5	PWAEEEKGRVYGDGSARILHVYTTREGFSFEALPPRASCETPASTPEAHEHAPAHSNPSGR
	ADAMTS9	DEQEDEEEQNKPHEIYRRSAPQREPSTGRHACDTSEHKNRHSKDKKKTRARKWGERINLA
	humanPJ01256	LSWKLGRAAQGSSPSHVLYKRSTEPHAPGASEVLVTSRTWELAHQPLHSSDLRLGLPQKQ
	mousePJ01256	_____
	ADAMTS6	TEDSK—HFSYENGHPHVIYKKSALQQRHLYDHS HCGVSDFTSRGKPWWLNDTST—
10	ADAMTS7	PARP—GHAQPHVVYKQAPERLAQRGDS—SAPSTCGVQVYPELESRRER—
	ADAMTS2	LAAQEAEGGRVHVYRR—PPTSPPLGGPQALDTGAS—LDSLDSL—
	ADAMTS3	KQMEE—EKGRHVYKRSVEQAPIDMSKDFHYRESGLEGLDLG—

15 表 1 2

	ADAMTS1	EDEGPQWS—PQDPALQGVGQPTGTGSIR—KKRFVSSHRYVETMLVADQSMAEFH
	ADAMTS4	SGQGPMCN—VKAP—LGSPS—PRPRR—AKRFASLSRFVETLVVADDKMAAFH
	ADAMTS8	EDSEEEESQ—EEEAE GASEPPPLGATSR—TKRFVSEARFVETLLVADASMAAFY
	ADAMTS5	AALASQLL—DQSALSPAGGSGPQTWWRR—RRRSISRARQVELLLVADASMARLY
20	ADAMTS9	GDVAALNSGL—ATEAFSAYGNKTDN TREKTRHRRTKRFLSYPRFVEVLVADNRMVSYH
	humanPJ01256	HFCGRRKKYMPQPPKEDLFLPDEYKSCLRHKRSLLRSHRNEELNVETLVVVDKMMQNH
	mousePJ01256	_____
	ADAMTS6	_____VSYSLPINNTHIHRQKRSVSIERFVETLVVADKMMVGYH
	ADAMTS7	_____WEQRQQWRRPRLRRLHQRSVSKEKWVETLVVADAKMVEYH
25	ADAMTS2	_____RALGVLEE HANSSRRRARRHAADDDYNI EVLLGVDDSVVGFH
	ADAMTS3	_____TVYGNIHQQLNETMRR—RRHAGENDYNI EVLLGVDDSVVRFH

表 1 3

	ADAMTS1	G-SGLKHYLLTLFSVAARLYKHPSIRNSVSLVVKILVIHDEQKGPEVTS-NAALTLRNF
	ADAMTS4	G-AGLKRYLLTVMAAAKAFKHPSIRNPVSLVTRLVILGSGEEGPQVGP-SAAQTLRSF
	ADAMTS8	G-ADLQNHILTLMSVAARIYKHPSIKNSINLMVVKVLIVEDEKWGPEVSD-NGGLTLRNF
5	ADAMTS5	G-RGLQHYLLTLASIANRLYSHASINHLRLAVVKVVVLGDKDKSLEVSK-NAATTLKNF
	ADAMTS9	G-ENLQHYILTLMSIVASIYKDPSIGNLINIVIVNLIVIHNEQDGPSISF-NAQTTLKNL
	humanPJ01256	GHENITTYVLTILNMVSALFKDGTIGGNINIAIVGLILLEDEQPLVISH-HADHTLSSF
	mousePJ01256	-----
	ADAMTS6	GRKDI EHYILSVMNIVAKLYRDSSLGNVNIIVARLIVLTEDQPNLEINH-HADKSLDSF
10	ADAMTS7	GQPQVESYVLTIMNMVAGLFHDPSIGNPIHITIVRLVLEDEEEDLKITH-HADNTLKSF
	ADAMTS2	GKEHVQKYLLTLMNIVNEIYHDESLGAHINVVLVRIILLSYGKSMSEIGNPSQSLENV
	ADAMTS3	GKEHVQNYLLTLMNIVNEIYHDESLGVHINVVLVRMIMLGAKSISLIERGNPSRSLENV

15 表 1 4

	ADAMTS1	CNWQKQHNP-----PSDRDAEHYDTAILFTRQDLGG-SQTCDTLGMADVGTVCDPNR
	ADAMTS4	CAWQRGLNT-----PEDSDPDHFDTAIFLTRQDLGG-VSTCDTLGMADVGTVCDPAR
	ADAMTS8	CNWQRRFNQ-----PSDRHPEHYDTAILLTRQNFCCG-EGLCDTLGVADIGTICDPNK
	ADAMTS5	CKWQHGHNG-----LGDDHEEHYDAAIFLTREDLGG-HHSCDTLGMADVGTICSPER
20	ADAMTS9	CQWQHSKNS-----PGG-IHHDTAVLLTRQDICRA-HDKCDTLGLAELGTICDPYR
	humanPJ01256	CQWQSGLMG-----KDGTRHDHAILLTGLDICSWKNEPCDTLGFAPISGMQSKYR
	mousePJ01256	-----
	ADAMTS6	CKWQKSILSHQSDGNTIPENGI AHHDNAVLITRYDICTYKNKPCGTGLASVAGMCEPER
	ADAMTS7	CKWQKSIN-MKGDHP-LHHDTAILLTRKDLCAAMNRPCE TLGLSHVAGMCQPHR
25	ADAMTS2	CRWAYLQQK-----PDTGHDEYHDHAIFLTRQDFGPS-GMQGYAPVTGMCHPVR
	ADAMTS3	CRWASQQQR-----SDLNHSEHHDHAIFLTRQDFGPA-GMQGYAPVTGMCHPVR

表 1 5

	ADAMTS1	SCSVIEDDGLQAAFTTAHELGHVFNMPHDDAKQCASLNG-VNQDSHMMASMLSNLDHSQP
	ADAMTS4	SCAIVEDDGLQSAFTAAHELGHVFNMLHDNSKPCI SLNGPLSTSRHVMAPVMAHVDPEEP
	ADAMTS8	SCSVIEDEGLQAAHTLAHELGHVLSMPHDDSKPCTRLFGPMGKH-HVMAPLFVHLNQTLP
5	ADAMTS5	SCAVIEDDGLHAAFTVAHEIGHLLGLSHDDSKFCEETFG-STEDKRLMSSI LTSIDASKP
	ADAMTS9	SCSISEDSQLSTAFTIAHELGHVFNMPHDDNNKCK—EEGVKSPQHVMAPTLNFYTNPWM
	humanPJ01256	SCTINEDTGLGLAFTIAHESGHNFNGMIDHGE—GNMCKK—SEGNIMSPTLAGRNGVFS
	mousePJ01256	—————
	ADAMTS6	SCSINEDIGLGSFTIAHEIVHNFNGMNHGDI—GNSCG—RKVMK—QQNYGSS—
10	ADAMTS7	SCSINEDTGLPLAFTVAHELGHSGFIQHDGS—GNDCEPVGKRPFIMSPQLLYDAAPLT
	ADAMTS2	SCTLNHEDGFSSAFVVAHETGHVLMGEHDGQ—GNRCGDEVRLGSI MAPLVQAAAFHRFH
	ADAMTS3	SCTLNHEDGFSSAFVVAHETGHVLMGEHDGQ—GNRCGDETAMGSVMAPLVQAAAFHRYH

表 1 6

15		#####
	ADAMTS1	WSPCSAYMITSFLDNGHGECLEMDKPQN—PIQLPGDLP—TSYDANRQCQFTFGEDSKH
	ADAMTS4	WSPCSARFITDFLDNGYGHCLLDKPEA—PLHLPVTFPG—KDYDADRCQQLTFGPDSRH
	ADAMTS8	WSPCSAMYLTELLDGGHGDCLLDAPGA—ALPLPTGLPGRMALYQLDQOQRI FGPDFRH
	ADAMTS5	WSKCTSATITEFLDDGHGNCLLDLPRK—QILGPEELPG—QTYDATQQCNLTFGPEYSV
20	ADAMTS9	WSKCSRKYITEFLDTGYGECLLNEPESR—PYPLPVQLPG—ILYNVNKQCELI FGPQSQV
	humanPJ01256	WSPCSRQYLHKFLSTAQAI CLADQPKPVKEYKYPEKLP—ELYDANTQCKWQFGEKAKL
	mousePJ01256	—————TAQAI CLADQPKPVKEYKYPEKLP—QLYDANTQCKWQFGEKAKL
	ADAMTS6	—————HYCEYQSFFL—————VCLQSRXHHQLFREV
	ADAMTS7	WSRCSRQYITRFLDRGWGLCLDDPP—AKDIIDFPSVPPG—VLYDVSHQCRQLQYGAYSF
25	ADAMTS2	WSRCSQQLSRYLHS—YDCLLDDPFAH—DWPALPQLPG—LHYSMNEQCRFDFGLGYMM
	ADAMTS3	WSRCSGQELKRYIHS—YDCLLDDPFDH—DWPKLPELPG—INYSMDEQCRFDFGVGYKM

表 1 7

#####	
ADAMTS1	CP—DAASTCSTLWCTGTSGGVLVCQTKH—FPWADGTSCGEGKWCINGKCVNKTDRKHF
ADAMTS4	CP—QLPPPCAALWCSGHLNGHAMCQTKH—SPWADGTPCGPAQACMGGRCLHMDQLQDF
5 ADAMTS8	CPNTSAQDVCAQLWCH—TDGAEP LCHTKNGSLPWADGTPCGPGHLCSEGSCLPEEEVERP
ADAMTS5	CP—GMDVCARLWCAVVRGGQMVCLTKK—LPAVEGTPCGKGRI CLQGKCVDKTKKKYY
ADAMTS9	CP—YMMQCRRLWCNNVNGVHKGRTQH—TPWADGTECEPGKHCKYGFVCP—KEMD
humanPJ01256	CMLDFKKDICKALWCHRI GRKCETKFMPA——AEGTICGHDMWCRGGQCVKYGDEGPK
mousePJ01256	CMLDFRKDICKALWCHRI GRKCETKFMPA——AEGTLGGQDMWCRGGQCVKYGDEGPK
10 ADAMTS6	CRELWC—LSKSNRCV—TNSIPAAEGTLC——QTGN—I EKWCYQGDCVPFG—TWPQ
ADAMTS7	CEDMDN—VCHTLWCS—VGTTCCHSKLDAA——VDGTRCGENKWCLSGECVPVG—FRPE
ADAMTS2	CTAFRTFDPCQQLWCSHPDNYPYFCKTKKG——PPLDGTMCAPGKHCFKGHC IWLTPDILK
ADAMTS3	CTAFRTFDPCQQLWCSHPDNYPYFCKTKKG——PPLDGTCAAGKWGYKGHCMMKNANQOK
* . *	
* . * * * :	

15

(以下余白)

20

25

表 1 8

ADAMTS1	DTPFHGSWGMWGPWGDSCRTCGGGVQYTMR	ECNPNVPKNGGKYCEGKRVRYSNLEDCP
ADAMTS4	NIPQAGGWGPWGPWGDSCRTCGGGVQFSSRDCTR	VPVRNGGKYCEGRTRFRSCNTEDCP
ADAMTS8	KPVVDGGWAPWGPWGECSRTCGGGVQF	SHRECKDPEPQNGGRYCLGRRAKYQSCHEECP
5 ADAMTS5	STSSHGNWGSWGSWGQCSRSCGGGVQF	AYRHCCNPAPRNNGRYCTGKRAIYRSCSLMPCP
ADAMTS9	VPVTDGSWGSWSPFGTCSRTCGGGIKTAI	RECNRPEPKNGGKYCVGRRMKFKSCNTEPCL
humanPJ01256	P—THGHWSDWSSWSPCSRTCGGGVSHRSRLCTN	PKPSHGGKFCEGSTRTLKLCNSQKCP
mousePJ01256	P—THGHWSDWSPWSPCSRTCGGGISHRDRLCTN	PRPSHGGKF—————
ADAMTS6	S—IDGGWGPWSLWGECSRTCGGGVSSSLRHCDSP	APSGGGKYCLGERKRYRSCNTDPCP
10 ADAMTS7	A—VDGGWGSWSAWSICSRSCGMGVQSAERQCTQ	PTPKYKGRYCVGERKRFRCLCNLQACP
ADAMTS2	R—DGSWGAWSPPFGSCSRTCGTGKFRTRQC	DNPHANGGRTCSGLAYDFQLCSRQDCP
ADAMTS3	Q—DGNWGSWTKFGSCSRTCGTGVRFRTRQC	NNMPINGGQDCPGVNFYQLCNTEECQ

\* \* . \* : . \*\*\*: \*\* \*:      \* \* \* \* \* :

15 表 1 9

	ADAMTS1	DNNGKTFREEQCEAHNEFSKASFGSGPAVEWI PKYAGVSPKDRCKL I CQAKG I GYFFVLQ
	ADAMTS4	TGSALTFREEQCAAYNHRTDLFKSFPGPMDWVPRYTGVAPODQCKLTCQARALGYYYVLE
	ADAMTS8	P-DGKSFREQQCEKYNAYNYTDMD-GNLLQWVPKYAGVSPRDRCKLFCRARGRSEFKVFE
	ADAMTS5	P-NGKSFRHEQCEAKNGYQSDAKGVKTFVEWVPKYAGVLPADVCKLTCRAKGTGYVVFS
20	ADAMTS9	K-QKRDFRDEQCAHFDGKHFNI NGLLPNVRWVPKYSG I LMKDRCKLFCRVAGNTAYYQLR
	humanPJ01256	R-DSVDFRAAQCAEHNSR——RFRGRHYKWKP-YTQVEDQDLCKLYC I AEGDFFFSLS
	mousePJ01256	—————
	ADAMTS6	L-GSRDFREKQCADFNDM——PFRGKYYNWKP-YTGG-GVKPCALNGLAEGYNFYTERA
	ADAMTS7	A-GRPSFRHVQCSEHFDAM——LYKGQLHTWVP-VVN—DVNPCELHCRPANEF AKKLR
25	ADAMTS2	D-SLADFREEQCRQWDLY——FEHGDAQHHWLP-HEHRDAKERCHLYCESRETGEVVSMK
	ADAMTS3	K-HFEDFRAQQCQQRNSH——FEYQNTKHHWLP-YEHPDPKKRCHLYCQSKETGDVAYMK

## 表 2 0

	ADAMTS1	PKVVDGTPCS—PDSTSVCGQGCVKAGCDRI I DSKKKFDKCGVCGGNGSTCKK I SGSVT
	ADAMTS4	PRVVDGTPCS—PDSSSVCGQGR I HAGCDRI I GSKKKFDKCMVCGGDGSGCSKQSGSFR
	ADAMTS8	AKV I DGTLCG—PETLA I CVRGQCVKAGCDHVVDSPRKLDKCGVCGGKGNSCRKVSGSLT
5	ADAMTS5	PKVTDGTECR—PYSNSVCVRGKCVRTGCDGI I GSKLQYDKCGVCGGDNSSTCK I VGTFN
	ADAMTS9	DRV I DGTPCG—QDTND I CVQGLCRQAGCDHVLNSKARRDKCGVCGGDNSSTCKTVAGTFN
	humanPJ01256	NKVKDGTPCS—EDSRNVC I DGI I CERVGCDNVLGSDAVEDVCGVCGNGNSACT I HRGLYT
	mousePJ01256	_____
	ADAMTS6	PAV I DGTQCN—ADSLD I C I NGECKHVGCDN I LGSDAREDRCRVCGGGGSTCDAI EGFFN
10	ADAMTS7	DAVVDGTPCYQVRASRDLC I NG I CKNVGCDFE I DSGAMEDRCGVCHGNGSTCHTVSGTFE
	ADAMTS2	RMVHDGTRCS—YKDAFSLCVRGDCRKGCDGVI GSSKQEDKCGVCGGDNSHCKVVKGTFT
	ADAMTS3	QLVHDGTHCS—YKDPYS I CVRGECVKVGCDKE I GSNKVEDKCGVCGGDNSHCRTVKGTFT

## 15 表 2 1

	ADAMTS1	S—AKPGYHDI I T I PTGATN I EVKQRNQRGSRNNGSFLA I KAAD—GTY I LNGDYTLSTLE
	ADAMTS4	K—FRYGYNNVVT I PAGATH I LVRQQGNPGHRS— I YLALKLPD—GSYALNGEYTLMPSP
	ADAMTS8	P—TNYGYND I VT I PAGATN I DVKQRSHPGVQNDGNYLALKTAD—GQYLLNGNLA I SA I E
	ADAMTS5	K—KSKGYTDVVR I PEGATH I KVRQFKAKDQTRFTAYLALKKKN—GEYL I NGKYM I STSE
20	ADAMTS9	T—VHYGYNTVVR I PAGATN I DVRQHSFSGETDDDNYLALSSSK—GEFLLNGNFVVTMAK
	humanPJ01256	KHHHTNQYYHMT I PSGARS I RI YEMNVS——TSY I SVRNAL—RRYYLNGHWTVDWPG
	mousePJ01256	_____
	ADAMTS6	DSLPRGGYMEVVQ I PRGCVH I EVREVAMS——KNY I ALKSEG—DDYY I NGAWT I DWPR
	ADAMTS7	EA EGLG—YVDVGL I PAGARE I RI QEVAEA——ANFLALRSEDPEKYFLNGGWT I QWNG
25	ADAMTS2	RSPKKHGY I KMF E I PAGARHLL I QEVDAT——SHHLAVKNLETGKF I LNEENDVDASS
	ADAMTS3	RTPRKLGYLKMF D I PPGARHVL I QEDEAS——PHI LA I KNQATGHY I LNGKG—EEAKS

## 表 2 2

	ADAMTS1	QDIMYKG-VVLRYSGSSAALERIR
	ADAMTS4	TDVWLPGAVSLRYSGATAASETLS
	ADAMTS8	QDILVKG-TILKYSGSIATLERLQ
5	ADAMTS5	TIIDING-TVMNYSGIWSHRDDFLHG
	ADAMTS9	REIRIGN-AVVEYSGSETAVERIN
	humanPJ01256	RYKFSGTTFDYRRSYNEPENLIATGPTNETLIVELLFQGRNPGVAWEYSMPRLGTEKQPP
	mousePJ01256	
	ADAMTS6	KFDVAGTAFHYKR
10	ADAMTS7	DYQVAGTTFTYARRGNWENLTSPG
	ADAMTS2	KTFIAMGVEWEYRDEGRETLOTMG
	ADAMTS3	RTFIDLGVEWDYNIEDDIESLHTDG

## 15 表 2 3

	ADAMTS1	SF
	ADAMTS4	GH
	ADAMTS8	SF
	ADAMTS5	MGY
20	ADAMTS9	ST
	humanPJ01256	AQPSYTWAI VRSECSVSCGGGQMTVREGCYRDLKFQVNMSFCNPKTRPVTGLVPCKVSAC
	mousePJ01256	
	ADAMTS6	
	ADAMTS7	
25	ADAMTS2	
	ADAMTS3	

## 表 2 4

	ADAMTS1	SPLKEPLTIQVLTV-GNALR
	ADAMTS4	GPLAQPLTLQVLVA-GNPQD
	ADAMTS8	RPLPEPLTVQLLTVPGEVFP
5	ADAMTS5	SATKEILIVQILAT-DPTKP
	ADAMTS9	DRIEQELLQVLVS-GKLYN
	humanPJ01256	PPSWSVGNWSAGSRTCGGGAQSRPVQCTRRVHYDSEVPASLCPQPAPSSRQACNSQSCP
	mousePJ01256	
	ADAMTS6	-PTDEPESLEALG-----PTSEN
10	ADAMTS7	-PTKEPVWIQVPASRGPGGSRGGVPRPSTLHGRSRPGGVSPGVSVEPGSEPGPPAAAST
	ADAMTS2	-PLHGTITVLVIP-VGDRVSLTYKYMIHEDSLN-VDDNNVLEEDSVVYEWALKKWSPCS
	ADAMTS3	-PLHDPVIVLII PQENDTRSSLTYKIIHEDSVPTINSNNVQEELDTFEWALKSWSQVS

## 15 表 2 5

	ADAMTS1	-----PKIKYTYFVK--
	ADAMTS4	-----TRLRYSFFVP--
	ADAMTS8	-----PKVKYTFVFPND
	ADAMTS5	-----LDVRYSFVPPKK
20	ADAMTS9	-----PDVRYSFNIPIE
	humanPJ01256	PAWSAGPWAECSHTCGKGWRKRAVACKSTNPSARAQLLPDAVCTSEPKPRMHEACLLQRC
	mousePJ01256	
	ADAMTS6	-----LIVMVLQEQ
	ADAMTS7	SVSPSLKWPNLVAAVHRGGWGQAPLGLGGWRRHLVLMG-----PRLPTQLLFQES
25	ADAMTS2	KPCGGGSQFTKYGCRRLDHKMVHRGFCAALSKP-----KAIRACNPQEC
	ADAMTS3	KPCGGGFQYTKYGCRKSDNKMVHRSFCEANKKP-----KPIRRMCNIQEC

表 2 6

	ADAMTS1	KKKESFNAIPTFSA
	ADAMTS4	RPTPST
	ADAMTS8	VDFSMQSSKERATTNI IQPLLHAQ
5	ADAMTS5	STPKVNSVTSHGSNKGSHTSQPG
	ADAMTS9	DKPQQFYWNHGPWQACSKPCQGERKRRLVCTRE SDQLTVSDQ
	humanPJ01256	HKPKKLQWLVSASQCSVTGERGTQKRFLKCAEKYVSGKYRELASKKCSHLPKPSLELER
	mousePJ01256	
	ADAMTS6	NLGI RYKFNVPI TRTGSQDNEVG
10	ADAMTS7	NPGVHYEY TIHREAGGHDEVPVV
	ADAMTS2	SQPWVTGEWEPCSQTGRTGMQVRSVRCIQPLHDN TTRSVHA
	ADAMTS3	THPLWVAEEWEHCTKTCGSSGYQLRTVRCLQPLLDG TNRSVHS

15 表 2 7

	ADAMTS1	WVIEEWGECSKSCELGWQRRLVECRDINGQP ASECA
	ADAMTS4	PRPTQDWLHRRAGILEILRR
	ADAMTS8	WVLGDWSECSSTCGAGWQRRTVECRDPGGA SATCN
	ADAMTS5	WVTGPWLACSRCTDGTWHTRTVQCQDGNRKL AKGCP
20	ADAMTS9	RCDRLPQPGHITPCGTDCDLRWHVASRSECSAQCGGLGYRTLDIYCAKYSRLDGKTEKVD
	humanPJ01256	ACAPLPCPRHPPFAAGPSRGSWFASPWSQCTASCGGGVQTRSVQCLAGGRPASGCLLHQ
	mousePJ01256	
	ADAMTS6	FTWNHQPWSECSATCAGG KMPTRQPTQR ARWRT
	ADAMTS7	FSWHYGPWTKCTVTCGRGEKWGRHSPTCRGLVSGGGHWLQ
25	ADAMTS2	KHCNDARPESRRACSRELCGRWRAGPWSQCSVTGNGTQERPVPCTADDSFGICQEER
	ADAMTS3	KYCMGDRPESRRPCNRVPCPAQWKTGPWSECSVTCGEGTEVRQVLCRAGDH CDGEK

## 表 2 8

	ADAMTS1	KEVKPASTRPCADHPCP	QWQLGEWSSCSK
	ADAMTS4	RPWAGRK	
	ADAMTS8	KALKPEDAKPCESQLCP	L
5	ADAMTS5	LSQRPSAFKQCLLKKC	
	ADAMTS9	DGFCSSHPKPSNREKCSG	ECNTGGWRYSAWTECSK
	humanPJ01256	KPSASLACNTHFCPIAEK	KDAFCKDYFHWCYLVPQ
	mousePJ01256		
	ADAMTS6	KHILSYA	LCLLKKL
10	ADAMTS7	LPAHCWAT	TGLEVCFSEPQ
	ADAMTS2	PETARTCRLGPCPRNI	SDPSKKSYYVQWLSRPDPDSPIRKISSKGHCQGDKSIFCRMEVL
	ADAMTS3	PESVRACQLPPCN	DEPCLGDKSIFCQMEVL

## 15 表 2 9

	ADAMTS1	TCGKGYYKRSCLKSLSHDGGVLSHESCDPLKKPKHFIDFCTMAECS	
	ADAMTS4		
	ADAMTS8		
	ADAMTS5		
20	ADAMTS9	SCDGGTQRRRAICVNTRNDVLDDSKGT	HQEKVTIQRCEFFCPQWKSGDWSEVRWEGC
	humanPJ01256	HGMCSHKFYGKQCKTCSKSNL	
	mousePJ01256		
	ADAMTS6	IGNISCRFASSCNLAKETLL	
	ADAMTS7	FSICEMRLAIALCPRPAGRVHG	
25	ADAMTS2	SRYCSIPGYNKLSCSKSNLYNNLTNVEGRIEPPPGKHNDID	VFMIPTLPVP
	ADAMTS3	ARYCSIPGYNKLCGESCSCRSSSTLPPPYLLEAAETHDDV	SNPSDLPRSLVMPTSLVPYH

## 表 3 0

	ADAMTS1	_____
	ADAMTS4	_____
	ADAMTS8	_____
5	ADAMTS5	_____
	ADAMTS9	YFP_____
	humanPJ01256	_____
	mousePJ01256	_____
	ADAMTS6	_____
10	ADAMTS7	_____
	ADAMTS2	—TVAMEVRPSPSTPLEVP——LNASTNATEDHPETNAVDEPYKIHGLEDEVQPPNL
	ADAMTS3	SETPAKKMSLSSI SSVGGPNAYAAFRPNSKPDGANLRQRSAGQAGSKTVRLVTVPSPPPT

## 15 表 3 1

	ADAMTS1	_____
	ADAMTS4	_____
	ADAMTS8	_____
	ADAMTS5	_____
20	ADAMTS9	_____
	humanPJ01256	_____
	mousePJ01256	_____
	ADAMTS6	_____
	ADAMTS7	_____
25	ADAMTS2	I PRRPS———PYEKTRNQR IQEL I DEMRKKEMLGKF—
	ADAMTS3	KRVHLSSASQMAAASFFAASDSI GASSQARTSKKDGI I DNRRPTRSSTLER

表 3 2

ドメイン名	配列
	MKPRARGWRGLAALWMLLAQVAEQAPACAMGPAAAAPGSPSVPRPPPPAER PGWMEKGEYDLVSAYEVDHRGDYVSHEIMHHQRRRRRAVAVSEVESLHLRLK GSRHDFHV
Pep_M12B_propep	DLRTSSSLVAPGFIVQTLGKTGKSVQTLPPEDFCFYQGSLRSHRNSSVAL STCQGLSGMIRTEEADYFLRPLPSHLSWKIGRAAQGSSPSHLYKRSTEPH APGASEVLVTSRTWELAHQPLHS
	SDLRLGLPQKQHFQGRKKYMPQPPKEDLILPDEYKSLRHKRSLRLRYHR NEELN
Reprolysin (Zn- metalloprotease)	VETLVVVDKKMMQNHGHENITTYVLTILNMVSALFKDGTIGGNINIAIVGL ILLEDEQPLVISHHADHTLSSFCQWQSGLMGKDGTRHDHAILLTGLDICS WKNPCDTLGFAPISGMCSKYRSCTINEDTGLGLAFTIAHESGHNFGMIDH GEGNMCKKSEGNIMSPTLAGRNGVFSWSPCSRQYLHKFLSTAQAICL ADQP
	KPVKEYK
disintegrin-like	YPEKLPGELYDANTQCKWQFGEKAKLCMLDFKKDICKALWCHRIGRKGETK FMPAAEGTICGHDMWVRGGQCVKYGD
	EGPKPTHGHW
TSP1_1	SDWSSWSPCSRTCGGGVSHRSRLCTNPKPSHGGKFCGSTRTLKLCNSQKC
	PRDSVDFRAAQCAEHNSRRFRGRHYKWKPYTQVEDQDLCKLYCIEAGFDF FSLSNKVKGDTPCSEDSRNVCIDGICERVGCDNVLGSDAVEDVCGVCNGNN SACTIHRGLYTKHHHTNQYYHMTIPSGARSIRIYEMNVSTSYISVRNALR RYYLNHWTVDWPGRYKFSGTTFDYRRSYNEPENLIATGPTNETLIV ELLFQGRNPGVAWEYSMPRLGTEKQPPAQPSYTWAIVRSECSVSGGGQMT VREGCYRDLKFQVNMFSFCNPKTRPVTGLVPCKVSACPPS
TSP1_2	WSVGNWSACSRTCGGGAQSRPVQCTRRVHYDSEPVPASLCPQAPSSRQAC NSQSC
	PPA
TSP1_3	WSAGPWAECSHTCGKGWRKRAVACKSTNPSARAQLLPDAVCTSEPKPRMHE ACLLQRC
	HKPKKLQ
TSP1_4	WLVSAWSQCSVTCEGTQKRFLKCAEKYVSGKYRELASKKCSHLPKP
	SLELERACAPLPCPRHPPFAAGPSR
TSP1_5	GSWFASPWSQCTASCGGGVQTRSVQCLAGGRPASGCLLHQKPSASLACNTH FC
	PIAEKKDAFCCKDYFHWGYLVPQHGMCCHKFYGKQCKTCSKSNL

(以下余白)

表 3 3

ドメイン名	配列
	TAQAICLADQPKPVKEYK
disintegrin-like	YPEKLPGQLYDANTQCKWQFGEKAKLCMLDFRKDICKALWCHRI GRKOETKFMPAA EGTLCGGQDMWCRGGQCVKYGD
	EGPKPTHGHW
TSP1_1	SDWSPWSPCSRTC GGGISHRDRLCTNPRPSHGGKF

## 実施例 1 4

(解析プログラムによる解析)

- 5 実施例 1 0 及び実施例 1 3 でヒト P J 0 1 2 5 6 について同定したドメインの  
アミノ酸配列 (表 3 4 : 検索したドメインとクエリーに用いた配列) を既知配列  
に対して解析プログラム (B L A S T 2 . 1) を用いて検索したところ、表 3 5  
(検索したクエリーに対してヒットした既知配列 : 最も相同性の高いもの) に示  
す配列とホモロジーを有することが明らかになった。また、実施例 1 2 及び実施  
10 例 1 3 でマウス P J 0 1 2 5 6 について同定したドメインのアミノ酸配列 (表 3  
6) について同様に検索を行ったところ、表 3 7 に示す配列とホモロジーを有す  
ることが明らかになった。

(以下余白)

表 3 4

ドメイン名	クエリーに用いた配列
Pep_M12B_propep	DLRTSSSLVAPGFI VQTLGKTGKSVQTLPPEDFCFYQGSLSHRNSSVALS TCQGLSGH I RTEADYFLRPLPSHL SWK I GRAAQGSSPSHVLYKRSTEPHAP GASEVLVTSRTWELAHQPLHS
Reprolysin (Zn- metalloprotease)	VETLVVVDKMMQNHGHENITTYVLTILNMVSALFKDGTIGGNINIAIVGLI LLEDEQPLVI SHHADHTLSSFCQWQSGLMGKDGTTRHDHAILLTGLDICSWK NEPCDTLGFAPISGMCSKYRSCTINEDTGLGLAFTIAHESGHNFQMIHDGEG NMCKKSEGNIMSPTLAGRNGVFSWSPCSRQYLHKFLSTAQAICLADQP
Cystein-rich region (disintegrin-like)	YPEKLPGELYDANTQCKWQFGEKAKLCMLDFKKDICKALWCHRI GRKCETKF MPAAEGTICGHDMWCRGGQCVKYGDEGPKPTHGHW
TSP1_1	SDWSSWSPCSRTCGGGVSHRSRLCTNPKPSHGGKFCEGSTRTLKLCNSQKC
TSP1_2	WSVGNWSACSRTCGGGAQSRPVQCTRRVHYDSEVPASLCPQAPSSRQACN SQSC
TSP1_3	WSAGPWAECSTGCGKWRKRAVACKSTNPSARAQLLPDAVCTSEPKPRMHEA CLLQRC
TSP1_4	WLVSASWSQCSVTGERGTQKRFLKCAEKYVSGKYRELASKKCSHLPKP
TSP1_5	GSWFASPWSQCTASCGGGVQTRSVQCLAGGRPASGCLLHQKPSASLACNTHF

表 3 5

ドメイン名	ヒットした既知配列 (ID : 説明 : 相同性)
Pep_M12B_propep	P79331 : BOVIN ADAM-TS 2 : 41%
Reprolysin (Zn- metalloprotease)	AF140675 : Homo sapiens zinc metalloprotease ADAMTS7 : 53%
Cystein-rich region (disintegrin-like)	D67076 : mouse ADAMTS-1 secretory protein containing thrombospondin motifs : 42%
TSP1_1	J250725 : human a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif : 55%
TSP1_2	AF163762 : Homo sapiens zinc metalloendopeptidase : 47%
TSP1_3	AF109907 : "hypothetical protein", Homo sapiens S164 gene, partial cds : 44%
TSP1_4	Z69360 : "F25H8.3"; Caenorhabditis elegans cosmid F25H8 : 41%
TSP1_5	AJ250725 : a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif Homo sapiens : 44%

表 3 6

ドメイン名	クエリーに用いた配列
Cystein-rich region (disintegrin-like)	YPEKLPGQLYDANTQCKWQFGEKAKLCMLDFRKDI CKALWCHRI GRKCETKF MPAAEGTLCGGQDMWCRGGQCVKYGD
TSP1_1	SDWSPWSPCSRTCAGGGI SHRDRLCTNPRPSHGGKF

表 3 7

ドメイン名	ヒットした既知配列 (ID : 説明 : 相同性)
Cystein-rich region (disintegrin-like)	D67076 : mouse ADAMTS-1 secretory protein containing thrombospondin motifs : 44%
TSP1_1	AJ250725 : a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 : 63%

## 5 実施例 1 5

(P J 0 1 2 5 6 マウスカウンターパートの取得)

実施例 8 で得た P J 0 1 2 5 6 マウスカウンターパートは部分 c D N A であったため、引き続き P J 0 1 2 5 6 のマウスカウンターパート取得を試みた。その際、後述する実施例 1 7 に示したようにマウス P J 0 1 2 5 6 の発現量が高かった発情期マウス卵巣より「T R I z o L<sup>®</sup> R e g e n t I n v i t r o g e n 社製」を用いて抽出した R N A を鋳型として R T - P C R を行なった。

R T 反応は、「T a K a R a R N A L A P C R K i t ( A M V ) V e r 1 . 1 ; 宝酒造製」を用い下記の条件で行なった。

(以下余白)

## R T反応液組成

	容量	試薬	終濃度
	4 $\mu$ l	マウス卵巣由来RNA溶液 (4 $\mu$ g)	
	2 $\mu$ l	RNase阻害剤 (40 U/ $\mu$ l)	1 U/ $\mu$ l
5	4 $\mu$ l	AMV リバース トランスクリプターゼ XL (5 U/ $\mu$ l)	0.25 U/ $\mu$ l
	16 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 mM
	8 $\mu$ l	10 $\times$ RNA PCR バッファー	1 $\times$
	8 $\mu$ l	dNTP (各10 mM)	0.4 mM
10	2 $\mu$ l	Random 9mer (50 $\mu$ M)	1.25 $\mu$ M
	2 $\mu$ l	オリゴdT-アダプター プライマー (2.5 $\mu$ M)	0.0625 $\mu$ M
	34 $\mu$ l	蒸留水	
	計80 $\mu$ l		

15

## R T反応プログラム

30°C, 10分

42°C, 60分

99°C, 5分

20

PCR反応は、ヒトPJ01256特異的プライマーPJ-S02 (下記参照) と前述のマウスPJ01256特異的プライマーmPJ-A03を用い、「KOD Dash、東洋紡製」にて下記の条件で行なった。

25 PJ-S02; 5'-ATGATGGAGAAGGGAACATG-3'

## P C R反応液組成

	容量	試薬	終濃度
	2 $\mu$ l	R T 反応産物	
	65 $\mu$ l	蒸留水	
5	10 $\mu$ l	10 $\times$ KOD Dash バッファー	1 $\times$
	20 $\mu$ l	dNTP (各2mM)	0.4mM
	1 $\mu$ l	PJ-S02 (50 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ M
	1 $\mu$ l	mPJ-A03 (50 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ M
	1 $\mu$ l	KOD Dash	
10	計100 $\mu$ l		

## P C Rプログラム

	94 $^{\circ}$ C, 3分/1サイクル	
15	94 $^{\circ}$ C, 20秒	} 40 サイクル
	60 $^{\circ}$ C, 10秒	
	75 $^{\circ}$ C, 30秒	
	75 $^{\circ}$ C, 10分/1サイクル	

その結果、約550bpのPCR産物が得られた。PCR産物は、常法に従い  
 20 プラスミドベクターに連結し、大腸菌形質転換体としてクローン化した後、プラスミドを抽出し塩基配列を決定した。

塩基配列決定の結果、得られたPCR産物はヒト特異的プライマーであるPJ-S02の20bpを除いて525bpであった。マウスPJ01256部分cDNA塩基配列(配列番号7)は、ヒトPJ01256全長cDNA配列(配列  
 25 番号3)の2,117-2,641番目に対してDNAレベルで84.7%(445/525)一致していた。また、コードされる推定アミノ酸配列(配列番号8)は175残基であり、ヒトPJ01256全長cDNA推定アミノ酸配列(配

列番号4)の450-624番目に94.8%(166/175)一致していた(図9)。

#### 実施例16

##### 5 (マウスPJ01256遺伝子の発現組織解析)

(1)マウスPJ01256遺伝子の発現組織を解析するため、下記のPCRプライマーを合成した。下記プライマーの組み合わせで、412bpのマウスPJ01256 cDNA断片が増幅される。

- 10 mPJ-S07; 5'-AGCGATATGTCTTGCTGATC-3'  
mPJ-A03; 5'-AAACTTCCCTCCATGAGATG-3'

24種のマウス臓器由来mRNAよりcDNAを調製した「マウスRAPID-SCAN™ GENE EXPRESSION PANEL、OriGene Technologies社製」を鋳型として、下記の条件でPCRを行なった。

#### PCR反応液組成

	容量	試薬
	2.5 $\mu$ l	10 $\times$ Ex Taq バッファー
20	2.0 $\mu$ l	dNTP (各2.5mM)
	0.2 $\mu$ l	10 $\mu$ M センズプライマー
	0.2 $\mu$ l	10 $\mu$ M アンチセンスプライマー
	19.85 $\mu$ l	蒸留水
	0.25 $\mu$ l	Ex Taq ポリメラーゼ (5U/ $\mu$ l)
25	計25 $\mu$ l	

## PCR運転プログラム

- 9.4°C, 2分/1サイクル  
 9.4°C, 30秒  
 6.0°C, 30秒 } 35 サイクル  
 5 7.2°C, 30秒 }  
 7.2°C, 10分/1サイクル

PCR産物を電気泳動し、臭化エチジウムで染色した後、紫外光照射下で画像を取り込み、各バンド濃度を比較した(図10)。

- 10 図10に示した結果から、マウスPJ01256遺伝子は、腎臓、精巣、卵巣、子宮で発現が高く、脳、脾臓、胃、皮膚で弱い発現が観察された。脳では、サイズの異なるバンドが観察され、スプライシングバリエーションの存在が示唆される。また、9.5日、12.5日、19日の胎児で発現が観察され、発生にしたがって発現量が増加していた。このことより、PJ01256は発生に関与している  
 15 ことが示唆された。

- (2) さらに、ノーザンハイブリダイゼーションにより、マウスPJ01256遺伝子のmRNA解析を行った。プローブは、アガロースゲル電気泳動法により分離・精製したマウスPJ01256 cDNAの部分断片(422bp、配列番号5)を用いた。プローブDNAのラベリングは、アマシャム ファルマシア バイオテク社の「DNA Labelling Beads (-dCTP)、Cat. No. 27-9240-01」と、<sup>32</sup>P-dCTP、Cat. No. PB10205」を用いて行った。DNAに取り込まれなかった<sup>32</sup>P-dCTPの除去は、アマシャム ファルマシア バイオテク社の「Probe Quant™ G-50 Micro Columns、Cat. No. 27-5335-01」により行った。マウス胎児由来mRNAをプロットしたフィルターは、クローンテック社より購入したMouse Embryo MTN Blot (Cat. No. 7763-1, Lot. 0120805)を用い、ハイブリダイゼーション  
 20  
 25

の条件はクローンテック社のプロトコールに従って行った (図11)。

図11で示した結果から、マウスPJ01256遺伝子は7日、11日、15日、17日めの胎児いずれの時期にも発現していることが示され、その発現量は発生にしたがって発現量が増加していた。このことより、PJ01256は発生  
5 に関与していることが示唆された。またmRNAの大きさは約5.5Kbで、明瞭なスプライシングバリエーションは検出されなかった。

#### 実施例17

(PJ01256の性周期による発現変動)

10 PJ01256の主な発現部位は実施例6に示したノーザンハイブリダイゼーション及びRT-PCRの結果から卵巢であった。卵巢は、性周期に従って排卵を繰り返すことで、組織形態が変化している。その過程では、細胞外マトリックスの分解及び再構築が繰り返されており、分解系及び合成系の種々の酵素が性周期に従って変動していると考えられる。PJ01256と同じADAMTSファミリーであるADAMTS1は、プロゲステロンの制御下で性周期に従って発現  
15 が変動することが報告されている (R. L. Robker et al, Steroids. (2000) 65 (10-11): 559-570; R. L. Robker et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2000) 97 (9): 4689-4694.)。

20 以下、マウスPJ01256の卵巢での性周期による発現変動を検討した。対照組織として、腎臓での検討も同様にを行った。

RT-PCR及び定量的PCRによる検討を行なうために、以下のプライマー及び定量的PCR用プローブを作製した。mPJ-がマウスPJ01256用、G3PDH-及びmGDH-が内部標準遺伝子として用いたマウスグリセルアル  
25 デヒド 3-リン酸脱水素酵素 (G3PDH) 用であり、Sはセンスプライマー、Aはアンチセンスプライマーを示す。

## RT-PCR用プライマー

mPJ-S07; 5'-AGCGATATGTCTTGCTGATC-3'  
 mPJ-A03; 5'-AAACTTCCCTCCATGAGATG-3'  
 G3PDH-S; 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'  
 5 G3PDH-A; 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

## 定量的PCR用プライマー

mPJ-S09; 5'-AAGGCCTTGTGGTGCCATCG-3'  
 mPJ-A07; 5'-CCTCCACGACACCACATGTCC-3'  
 10 mGDH-S01; 5'-TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT-3'  
 mGDH-A01; 5'-TTGAATTTGCCGTGAGTGGA-3'

## 定量的PCR用プローブ (TaqMan プローブ)

mPJ-P01; 5'-Fam-CCCTCTGCTGCTGGCAT  
 15 GAACTTGGTCTCA-Tamra-3'  
 mG3PDH-P01; 5'-Fam-CCATCAACGACCCC  
 TTCATTGACCTC-Tamra-3'

マウスはSlcICR系メス9週齢を5個体使用した。性周期は、採取当日及  
 20 び前日にスメアーテストを行ない判定した(表38)。卵巣及び腎臓を採取後、「TRIzol® Regent、Invitrogen社製」を用いて、添付プロト  
 コルに従いRNAを抽出した。

RT-PCRの第一次反応である逆転写反応(RT反応)は、上記で抽出した  
 RNAを鋳型として、「TaKaRa RNA LA PCR Kit (AMV)  
 25 Ver1.1; 宝酒造製」を用い、下記の条件で行なった。

## R T反応液組成

	容量	試薬
	4 $\mu$ l	RNA溶液 (4 $\mu$ g)
	2 $\mu$ l	RNase阻害剤 (40 U/ $\mu$ l)
5	4 $\mu$ l	AMV リバース トランスクリプターゼ XL
	16 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	8 $\mu$ l	10 $\times$ RNA PCR バッファー
	8 $\mu$ l	dNTP (各10 mM)
	2 $\mu$ l	Random 9mer (50 $\mu$ M)
10	2 $\mu$ l	オリゴdT-アダプター プライマー
	34 $\mu$ l	蒸留水
計80 $\mu$ l		

## R T反応プログラム

15	30°C, 10分
	42°C, 60分
	99°C, 5分

RT-PCRの第二次反応であるPCRは、上記のRT反応で調製したcDNA  
20 Aを鋳型として、以下の条件で行なった。

(以下余白)

## P C R反応液組成

容量		試薬
4	$\mu\text{l}$	R T反応溶液
12.94	$\mu\text{l}$	蒸留水
5	1.2 $\mu\text{l}$	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
	1.6 $\mu\text{l}$	10× LA PCR バッファー II
	0.08 $\mu\text{l}$	センスプライマー (50 $\mu\text{M}$ )
	0.08 $\mu\text{l}$	アンチセンスプライマー (50 $\mu\text{M}$ )
	0.1 $\mu\text{l}$	LA Taq (5U/ $\mu\text{l}$ )
10	計20 $\mu\text{l}$	

## P C R運転プログラム

	94°C, 2分/1サイクル	
15	94°C, 30秒	35サイクル (mP J 0 1 2 5 6の場合) 又は20サイクル (G 3 P D Hの場合)
	60°C, 30秒	
	72°C, 1分	
	72°C, 10分/1サイクル	

20 P C R産物を電気泳動し、臭化エチジウムで染色した後、紫外光照射下で画像を取り込み、各バンド濃度を比較した (図12、表38)。G 3 P D Hのバンドが各個体及び卵巣、腎臓でほとんど同じだったのに対し、P J 0 1 2 5 6のバンド濃度は発情期である個体1の卵巣で特に強く、個体1及び個体3の腎臓、個体4の卵巣で若干強かった。

25 性周期による発現変動の更なる検討のため、定量的P C Rによる解析を行なった。定量的P C R反応溶液は、「TaqMan® Universal PCR Master Mix、Applied Biosystems社製」を用い、前

記のRT反応で調製したcDNAを鋳型として、以下の通り調製した。

#### 定量的PCR反応液組成

	容量	試薬
5	5 $\mu$ l *	RT反応産物
	5.5 $\mu$ l *	蒸留水
	0.5 $\mu$ l	センスプライマー (50 $\mu$ M)
	0.5 $\mu$ l	アンチセンスプライマー (50 $\mu$ M)
	12.5 $\mu$ l	2 $\times$ TaqMan <sup>®</sup> ユニバーサル PCR マスター
10		ミックス
	1 $\mu$ l	TaqManプローブ (5 $\mu$ M)

計 25  $\mu$ l

\* ; なお、G3PDHについては、RT反応産物を0.5  $\mu$ l、蒸留水を10  $\mu$ lで行った。

15

反応は、定量的PCR装置「GenneAmp 5700<sup>®</sup> Sequence Detection System、Applied Biosystems社製」に上記の反応溶液を入れたチューブを1サンプル当たり2本ずつセットし、以下の運転プログラムにて行なった。

20

#### 定量的PCR運転プログラム

	50°C, 2分/1サイクル	
	95°C, 10分/1サイクル	
	95°C, 20秒	} 50 サイクル
25	60°C, 1分	

定量的PCR装置で得られた増幅曲線より、G3PDH及びPJ01256の相対濃度を得た。続いて、PJ01256の相対濃度を内部標準遺伝子であるG3PDHの相対濃度で除算し、補正した。補正値を組織及び遺伝子ごとの最低値で除算し、相対濃度比を算出した（表38）。その結果、発情期である個体1の卵巣のみ、PJ01256の発現が高くなっていることが確認された。

表38

個体番号	性周期判定		RT-PCRでのバンド濃度比較		定量的PCRより得られた相対濃度比	
	解剖前日	解剖日	卵巣	腎臓	卵巣	腎臓
1	休止期 ～ 発情前期	発情期	+++	++	7.19	1.97
2	発情後期	発情後期 ～ 休止期	+	+	1.13	1.00
3	発情期	発情後期	+	++	2.11	1.83
4	休止期	発情前期 ～ 発情期	++	+	1.72	1.49
5	発情前期 ～ 発情期	発情後期	+	+	1.00	1.42

RT-PCR及び定量的PCRの結果から、共に発情期卵巣ではPJ01256の発現が亢進していることが示された。このことより、PJ01256は性周期に従って卵巣での発現が変動しており、排卵に伴う卵巣の細胞外マトリックスの分解及び再構築に関与していることが示唆された。

## 実施例 18

(組換えヒトPJ01256タンパク質の細胞外マトリックス局在化の検討)

実施例5においてCOS7細胞で発現させたヒトPJ01256タンパク質が細胞外マトリックス (ECM) に局在していることを確認するため、論文 (Kuno, K. and Matsushima, K. J. Biol. Chem. (1998) 273, 13912-13917) の方法に準じて以下の検討を行った。

75 cm<sup>2</sup>組織培養用フラスコに約50%コンフレントに付着生育させたCOS7細胞に対し、10  $\mu$ gのpCMH01-PJ01256を遺伝子導入した。対照には10  $\mu$ gのpCMH01を用いた。遺伝子導入は市販の「LipofectAMINE PLUS、Lifetechnologies社製」を用い、添付プロトコルに従って行った。遺伝子導入3日後、培養上清液 (12 ml) を回収し、等量の2 $\times$ SDS電気泳動用緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH 6.8、20% グリセロール、12% 2-メルカプトエタノール、4% SDS、プロモフェノールブルーにより染色) を添加後、100 $^{\circ}$ Cで5分間加熱して培地画分 (Medium Fraction) とした。フラスコに付着した細胞をPBS (Phosphate Buffered Saline) で2回洗浄した後、5 mMのEDTA (pH 7.5) を添加したPBSで細胞を遊離させた。懸濁した細胞液を遠心分離 (1,000 $\times$ g、5分、室温) して細胞を沈殿させ、氷冷したPBSで洗浄後、0.05 mlのRIPAバッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、1.0% NP40、0.5% デオキシコレート、0.1% SDS、1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド) に懸濁して細胞を破碎した。細胞破碎液に等量の2 $\times$ SDS電気泳動用緩衝液を添加後、100 $^{\circ}$ Cで5分間加熱して細胞画分 (Cell Fraction) とした。細胞を遊離させた後にフラスコに付着したECM画分を、1.0 mlの1 $\times$ SDS電気泳動用緩衝液に懸濁し、100 $^{\circ}$ Cで5分間加熱して細胞外マトリックス画分 (ECM Fraction) とした。各画分サンプル5  $\mu$ lをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供した。SD

S-ポリアクリルアミド電気泳動は、市販の「マルチゲル4/20、第一化学薬品社製」を「カセット電気泳動槽「第一」DPE-120」にセットし、40mA定電流で1時間行った。泳動用緩衝液は、「Tris-Glycine-SDS Powder、宝酒造製」を用い、分子量マーカーは、「Precision Protein Standards、BIO-RAD社製、Code. No. 161-0372」を用いた。泳動終了後、「ミニトランスプロット、BIO-RAD社製」を用いてエレクトロトランスファーによりPVDF膜「TEFCO社製、Code. No. 03-056」にプロットした。エレクトロトランスファーは、「Tris-Glycine Powder、宝酒造製」にメタノールを20%添加した緩衝液中で、150mA定電流で1.5時間行った。プロットしたPVDF膜は、「抗C-Myc(9E10)抗体、Santa Cruz Biotechnology社製、Code. No. SC-40」を1次抗体として反応させ、「Anti-Mouse IgG-POX、Sigma社製」を2次抗体として反応させた。抗体にラベルされたホースラディッシュペーパーオキシダーゼの検出には「ECL Plus、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製」を用い、添付されていた標準プロトコルに従って行った。結果を図13に示した。

図13に示したように、抗Myc抗体を用いたウェスタンブロットング解析の結果、pCMH01-PJ01256をトランスフェクトしたCOS7細胞では、発現したPJ01256タンパク質のシグナルは主にECM画分に検出された。対照としたpCMH01では該当するシグナルは検出されなかった。以上の結果より、COS7細胞で発現したヒトPJ01256タンパク質は主にECMに局在していることが示された。

#### 実施例19

#### 25 (PJ01256のエクソン部位決定と染色体マッピング)

PJ01256のゲノム配列及び疾患との関わりを調べるため、ゲノム配列を検索し、染色体マッピングを行なった。

ヒトPJ01256全長cDNA (配列番号3) で公共データベースであるGenBankを検索したところ、染色体クローンAC010269.5がヒットした。同配列に対しヒトPJ01256 cDNAをGT-AGルールにあてはめ、エクソン部位を決定した。その結果、ヒトPJ01256全長cDNA 561  
5 0bp中1-3558bpが、エクソン1~18としてAC010269.5上に存在した。エクソン19以降はAC010269.5上には存在しなかった(表39、図14)。

NCBIのHuman Genome Map Viewer ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/hum\\_srch?chr=hum\\_chr.inf&query](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/hum_srch?chr=hum_chr.inf&query))を用いて、  
10 ヒトPJ01256のゲノム配列であるAC010296.5の染色体上の位置をデータベース上で調べ、染色体マッピングを行なった。その結果、2001年9月19日現在AC010269.5は、5番染色体短腕15.31(5p15.31)に存在していた(図15)。なお、同ゲノム配列は2001年5月8日には  
15 5p15.33、同年5月10日には5p15.2に存在していた。

染色体マッピングの結果から、PJ01256は5p15.2-15.3に存在することが示された。5p15.2-15.3は、5P-症候群(*Cri-du-chat syndrome*)の欠失部位であり(Overhauser J, et al., Hum. Mol. Genet. (1994) 3(2):247-25  
20 2)、同症候群との関連が示唆される。

(以下余白)

表 3 9

## P J 0 1 2 5 6 のエクソン部位

エクソン 番号	PJ01256 cDNA (bp) の位置	AC010269.5 (bp) の位置	長さ (bp)
1	1 - 841	45637 - 46477	841
2	842 - 944	46602 - 46704	103
3	945 - 1270	52067 - 52392	326
4	1271 - 1532	87973 - 88234	262
5	1533 - 1732	91981 - 92180	200
6	1733 - 1816	93654 - 93737	84
7	1817 - 1976	95900 - 96059	160
8	1977 - 2082	97614 - 97719	106
9	2083 - 2220	106061 - 106198	138
10	2221 - 2374	115022 - 115175	154
11	2375 - 2470	128718 - 128813	96
12	2471 - 2619	138286 - 138434	149
13	2620 - 2792	140934 - 141106	173
14	2793 - 2923	142877 - 143007	131
15	2924 - 3047	145059 - 145182	124
16	3048 - 3292	1450589 - 145833	245
17	3293 - 3431	147963 - 148101	139
18	3432 - 3558	168576 - 168702	127
19-	3559-	未知	未知

## 実施例 2 0

## 5 (ヒト P J 0 1 2 5 6 の昆虫細胞系での大量発現)

ヒト P J 0 1 2 5 6 の大量発現を行なうため、昆虫細胞／バキュロウィルスでの発現系を構築した。発現系構築には「Bac-To-Bac<sup>®</sup> Baclo virus Expression System、Life technologies 社 (現 Invitrogen 社) 製」を使用した。

- 10 発現させたヒト P J 0 1 2 5 6 の C 末端に MycHis タグ配列を付加するため、組換えバキュロウィルス DNA プラスミド (Bacmid) 調製用ベクター「pFastBac1、Life technologies 社 (現 Invitrogen 社) 製」を改変した。すなわち、下記の合成 DNA (MEHT-1、M

EHT-2、MEHT-3、及びMEHT-4) をアニーリングさせ連結したものを、pFastBac1のSphI及びHindIIIサイトに挿入した。作製したpFastBac1-HTのクローニング部位を図16に示す。

5 MEHT-1 ;

5'-CGGTACCAAGCTTGAACAAAAACTCATCTC  
AGAAGAGGATCTGAATAGC-3'

MEHT-2 ;

5'-GCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTTGA  
10 G-3'

MEHT-3 ;

5'-TTCTGAGATGAGTTTTTGTTCAGCTTGGT  
ACCGCATG-3'

MEHT-4 ;

15 5'-AGCTCTCAATGATGATGATGATGATGGTCG  
ACGGCGCTATTCAGATCCTC-3'

ヒトPJ01256 cDNAは実施例4で作成したpCMH01-PJ01256から制限酵素BamHI及びHindIIIで切り出し、pFastBac1-HTの同サイトに挿入した。作製したプラスミドpFastBac1-HT-PJ01256は、塩基配列を決定しPJ01256 cDNA下流にMycHis  
20 タグ配列が同一フレームで連結されたことを確認した(図17、配列番号9)。

昆虫細胞/バキュロウィルス発現系において効率良くPJ01256を分泌させるため、ミツバチ、メリチン(Honeybee Melittin)由来シ  
25 グナル配列(以下、メリチンシグナル、Tessier D.C. et al, Gene (1991) 98 (2): 177-183)を付加した。すなわち、下記の合成DNAをアニーリングさせたものを、pFastBac1-HT-PJ01

256のBamHIサイトに挿入した。

Cla-BamH;

5' - GATCGATGAAATTCTTAGTCAACGTTGCCC  
5 TTGTTTTTATGGTCGTGTACATTTCTTACAT  
CTACGCGGG - 3'

BamH-Cla;

5' - GATCCCCGCGTAGATGTAAGAAATGTACAC  
GACCAATAAAAACAAGGGCAACGTTGACTAAG  
10 AATTTCATC - 3'

作製したプラスミドpFastBac1-MS/HT-PJ01256-2は、塩基配列を決定しPJ01256 cDNA上流にメリチンシグナル配列が同一フレームで連結されたことを確認した (図18、配列番号10)。

- 15 また、活性型PJ01256を高効率で得る目的で、PJ01256自体のシグナル配列及びメタロプロテアーゼ活性を抑制すると考えられるプロ領域を除いたものも作製した。すなわち、下記のプライマーで増幅される257bpのヒトPJ01256断片をBamHI及びXbaIで消化し、pFastBac1-MS/HT-PJ01256-2の両サイト間に連結した。なお、BHPJ-S
- 20 05は、5'側9merがBamHIの認識配列と同酵素での消化を可能とするスパーサー配列であり、3'側21merはヒトPJ01256全長cDNA配列 (配列番号3) の1593~1613番目に完全一致する配列よりなるプライマーである。PJ-A25はヒトPJ01256全長cDNA配列 (配列番号3) の1811~1840番目の相補鎖に完全一致する配列よりなるプライマーであ
- 25 る。

BHPJ-S05 ;

5'-GAAGGATCCTACGGCATAAGCGCTCTCTTC  
-3'

PJ-A25 ;

5 5'-GTGGTGACTTATCACCAGTCCTGGCTGTTC  
-3'

作製したプラスミド pFastBac1-MS/HT-PJ01256-1 は、  
塩基配列を決定しメリチンシグナル配列下流にヒト PJ01256 cDNA のメ  
10 タロプロテアーゼドメインが同一フレームで連結されたことを確認した(図19、  
配列番号11)。

作製した組換え Bacmid 調製用ベクター pFastBac1-HT-PJ  
01256、pFastBac1-MS/HT-PJ01256-1 及び pFa  
stBac1-MS/HT-PJ01256-2 で、組換え Bacmid 調製用  
15 大腸菌;「E. coli DH10 Bacコンピテントセル、菌体内に Bacm  
id を有する、Life technologies 社 (現 Invitrogen  
社) 製」をそれぞれ形質転換した。その結果、Tn7 部位特異的トランスポジ  
ションによって、それぞれの PJ01256 の発現ユニットが組換えられた Bac  
mid (Bacmid-HT-PJ01256、Bacmid-MS/HT-P  
20 J01256-1 及び Bacmid-MS/HT-PJ01256-2) を得た。

Bacmid-HT-PJ01256、Bacmid-MS/HT-PJ01  
256-1 及び Bacmid-MS/HT-PJ01256-2 をそれぞれ2ク  
ローンずつ Sf9 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入はリポソーム法にて行なっ  
た。4日後、培養上清を0.2µmのフィルターでろ過し、それぞれの PJ01  
25 256組換えバキュロウィルス液(BV sol. PJ01256-HT No.  
1、BV sol. PJ01256-HT No. 2、BV sol. PJ01  
256-MSHT1 No. 1、BV sol. PJ01256-MSHT1

No. 2、BV sol. PJ01256-MSHT2 No. 1及びBV sol. PJ01256-MSHT2 No. 2)として回収した。

回収したそれぞれのPJ01256組換えバキュロウィルス液を $3 \times 10^6$ 個のSf9細胞に約moi10で感染させた。3日後、細胞を10mM Tris (pH8)、1mM EDTAで懸濁し、等量の2×サンプルバッファーを加え、約5分間煮沸させた後、1/100量をウェスタンブロッティングに供した。ウェスタンブロッティングは、「Penta-His HRP Conjugate、QIAGEN社製」と「ECL PLUS、Amersham Pharmacia Biotech社製」を用いて、それぞれの添付プロトコルに従って行なった。

ウェスタンブロッティングの結果を図20に示した。昆虫細胞/バキュロウィルス系での発現の結果、それぞれの分子量に応じたPJ01256の発現産物が得られた。本発現系の構築により、PJ01256の大量調製が可能となった。

15

#### 産業上の利用可能性

以上説明したように本発明は、新規なADAMTSファミリータンパク質及びそれをコードする新規遺伝子を提供するものであり、卵巣での高発現及び性周期における発現量の変動、腫瘍細胞における存在の低下、及び当該遺伝子の染色体上の位置が5P-症候群の欠失部位に位置することを特徴とする。この特性を利用した新規医薬組成物、診断・治療手段の提供はADAMTSファミリータンパク質関連の臨床・基礎の医用領域において大きな有用性を提供する。

## 請求の範囲

1. 下記の群より選ばれるADAMTSファミリーに属するポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質；
- 5   ①配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、  
      ②前記①のポリペプチドを含有するポリペプチド、  
      ③前記①のポリペプチドと少なくとも約50%のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド、
- 10   及び  
      ④前記①～③のポリペプチドにおいて、そのアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するポリペプチド。
2. 配列表の配列番号1又は配列番号4又は配列番号8に記載のアミノ酸配列の一部を有する部分ペプチドであって、少なくとも約8個の連続するアミノ酸配列
- 15   を有するペプチド。
3. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその相補鎖。
4. 配列表の配列番号2又は配列番号3又は配列番号7に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド又はその相補鎖。
- 20   5. 請求の範囲第3項又は第4項に記載のポリヌクレオチド又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。
6. 請求の範囲第2項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその相補鎖。
7. 配列表の配列番号2又は配列番号3又は配列番号7に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド又はその相補的塩基配列の少なくとも約15個の連続する塩
- 25   基配列からなるポリヌクレオチド。
8. 請求の範囲第6項又は第7項に記載のポリヌクレオチド又はその相補鎖とス

トリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

9. 請求の範囲第3項ないし第8項に記載のいずれか1つのポリヌクレオチド又はその相補鎖を含有する組換えベクター。

10. 請求の範囲第9項に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

- 5 11. 請求の範囲第10項に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求の範囲第1項又は第2項に記載のポリペプチド若しくは該ポリペプチドを有するタンパク質又はペプチドの製造方法。

12. 請求の範囲第1項又は第2項に記載のポリペプチド若しくは該ポリペプチドを有するタンパク質又はペプチドを免疫学的に認識する抗体。

- 10 13. 少なくともADAMTSファミリーポリペプチドを認識する、請求の範囲第12項に記載の抗体。

14. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質と相互作用してその活性を阻害若しくは促進する作用を有する化合物、及び／又は請求の範囲第3項ないし第5項に記載のいずれか1つのポリヌクレオチド

- 15 ドと相互作用してその発現を阻害若しくは促進する作用を有する化合物のスクリーニング方法であって、請求の範囲第1項又は第2項に記載のポリペプチド若しくは該ポリペプチドを有するタンパク質又はペプチド、請求の範囲第3項ないし第8項に記載のいずれか1つのポリヌクレオチド、請求の範囲第9項に記載のベクター、請求の範囲第10項に記載の形質転換体、請求の範囲第12項若しくは  
20 第13項に記載の抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

15. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質と相互作用してその活性を阻害若しくは活性化する化合物、又は請求の範囲第3項ないし第5項に記載のいずれか1つのポリヌクレオチドと相互作用して  
25 その発現を阻害若しくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、化合物とポリペプチド又はタンパク質との間の相互作用を可能にする条件下で、ポリペプチド又はタンパク質とスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相

- 相互作用を評価し（かかる相互作用はポリペプチド又はタンパク質と化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである）、次いで、化合物とポリペプチド又はタンパク質との相互作用により生じるシグナルの存在又は不存在又は変化を検出することにより、化合物がポリペプチド
- 5 又はタンパク質と相互作用して、その活性を活性化又は阻害するかどうかを決定することを含む方法。
16. 請求の範囲第14項又は第15項に記載の方法でスクリーニングされる化合物であって、請求の範囲第1項に記載のポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタンパク質と相互作用してその活性を阻害又は促進する化合物又はその塩。
- 10 17. 請求の範囲第14項又は第15項に記載の方法でスクリーニングされる化合物であって、請求の範囲第3項ないし第5項に記載のいずれか1つのポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害若しくは促進する化合物又はその塩。
18. 請求の範囲第1項又は第2項に記載のポリペプチド若しくは該ポリペプチドを有するタンパク質又はペプチド、請求の範囲第3項ないし請求の範囲第8項
- 15 に記載のいずれか1つのポリヌクレオチド、請求の範囲第9項に記載のベクター、請求の範囲第10項に記載の形質転換体、請求の範囲第12項若しくは第13項に記載の抗体、又は請求の範囲第16項若しくは第17項に記載の化合物のうちの少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする医薬組成物。
19. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチド又は該ポリペプチドを有するタン
- 20 パク質の発現又は活性に関連した疾病の診断方法であって、(a)該ポリペプチド又はタンパク質をコードしている核酸、及び／又は(b)試料中の該ポリペプチド又はタンパク質をマーカーとして分析することを含む方法。
20. 請求の範囲第1項又は第2項に記載のポリペプチド若しくは該ポリペプチドを有するタンパク質又はペプチド、請求の範囲第3項ないし第8項に記載のい
- 25 ずれか1つのポリヌクレオチド、又は請求の範囲第12項若しくは第13項に記載の抗体のうちの少なくともいずれか1つを含んでなる、(a)該ポリペプチド又はタンパク質をコードしている核酸、及び／又は(b)試料中の該ポリペプチド

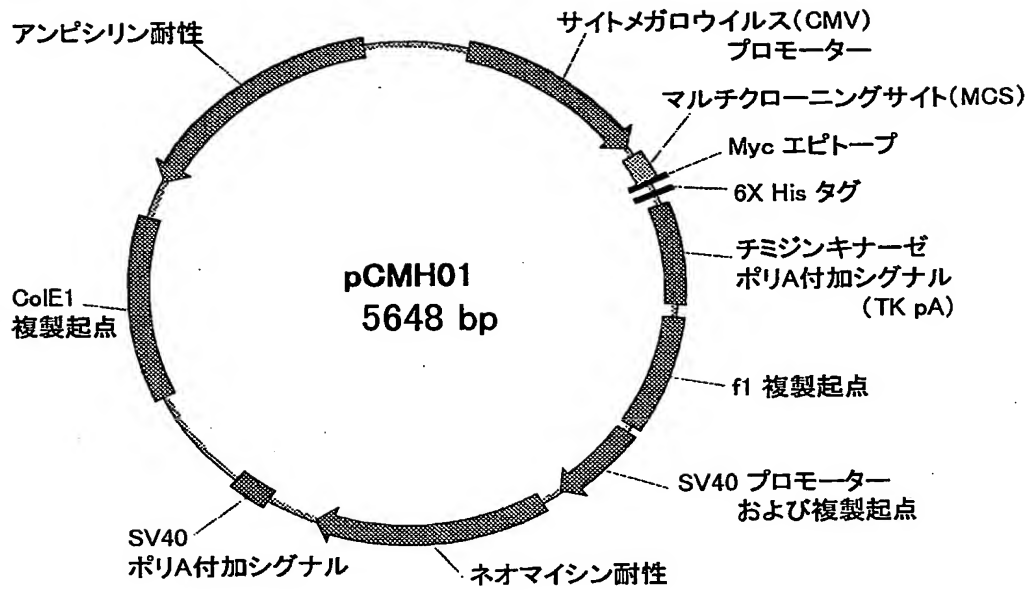
- 又はタンパク質をマーカーとして分析することを含む方法に使用する試薬キット。
- 2 1. 請求の範囲第 3 項ないし第 8 項に記載のポリヌクレオチド又はその相補鎖をエクソンとして含有するヒトゲノム遺伝子断片たるポリヌクレオチド。
- 2 2. 請求の範囲第 2 1 項に記載のヒトゲノム遺伝子断片の塩基配列又はその相
- 5 補配列の少なくとも 1 5 個の連続する塩基配列からなるポリヌクレオチド。
- 2 3. 請求の範囲第 2 1 項又は第 2 2 項に記載のポリヌクレオチド又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。
- 2 4. 請求の範囲第 2 2 項又は第 2 3 項に記載のポリヌクレオチド又はその相補鎖をマーカー又はプライマーとして用いることを特徴とする疾病の診断方法。

1/13

図面

図 1

(A)



(B)

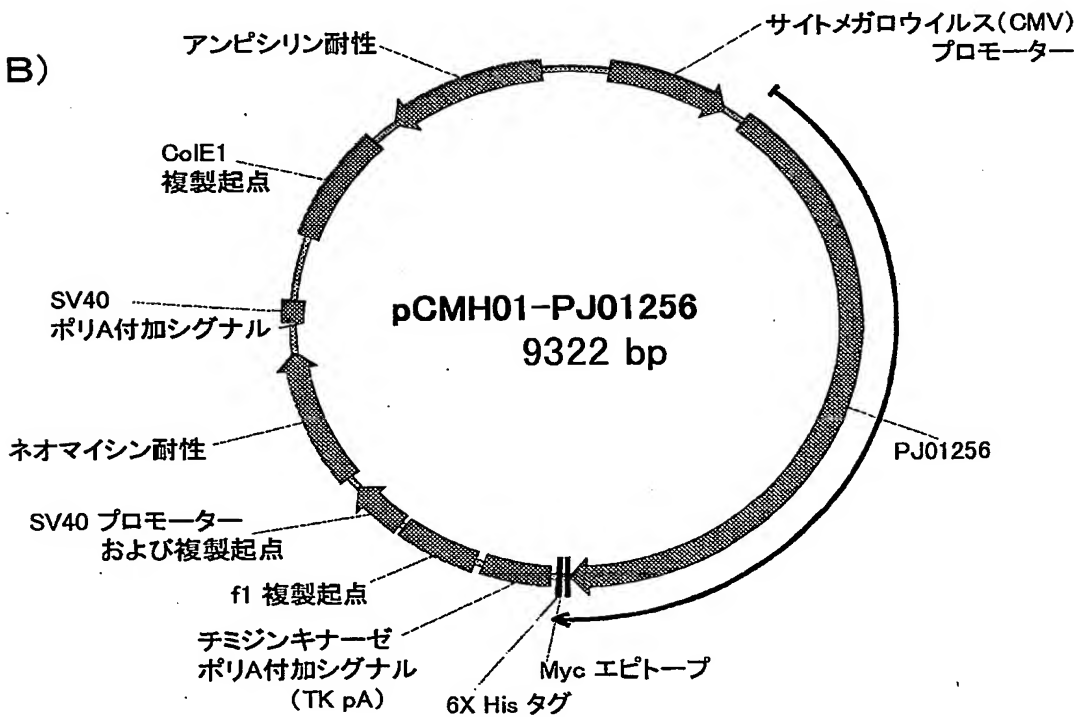


図 2

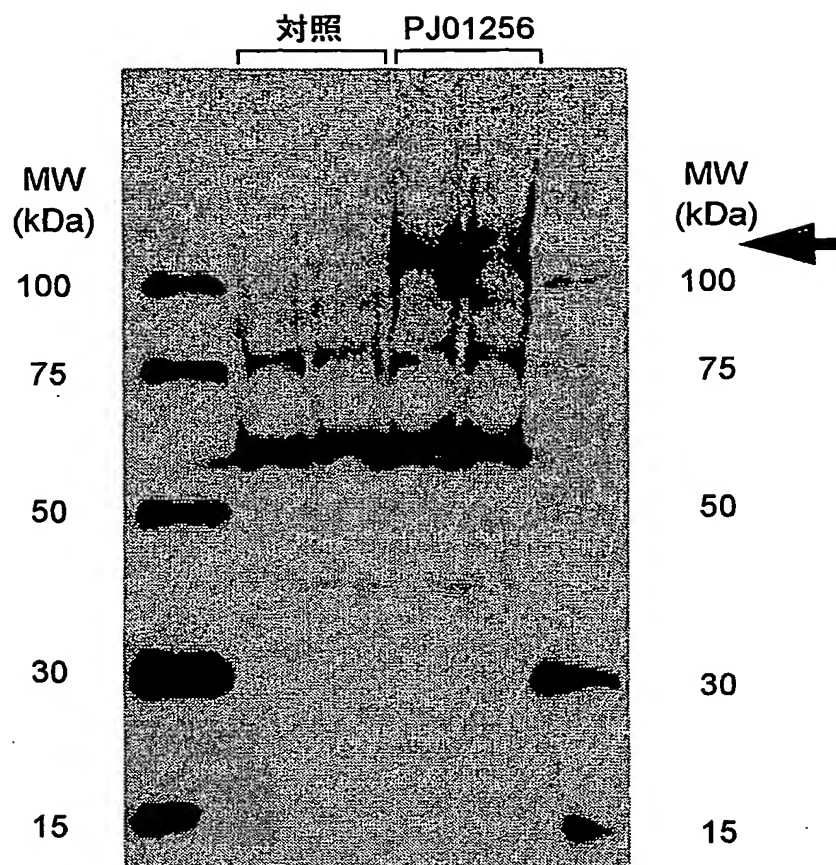


図 3

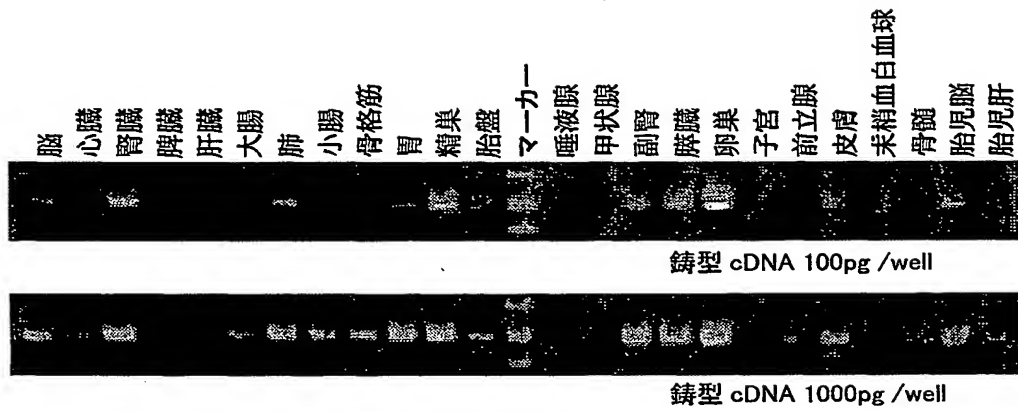


図 4

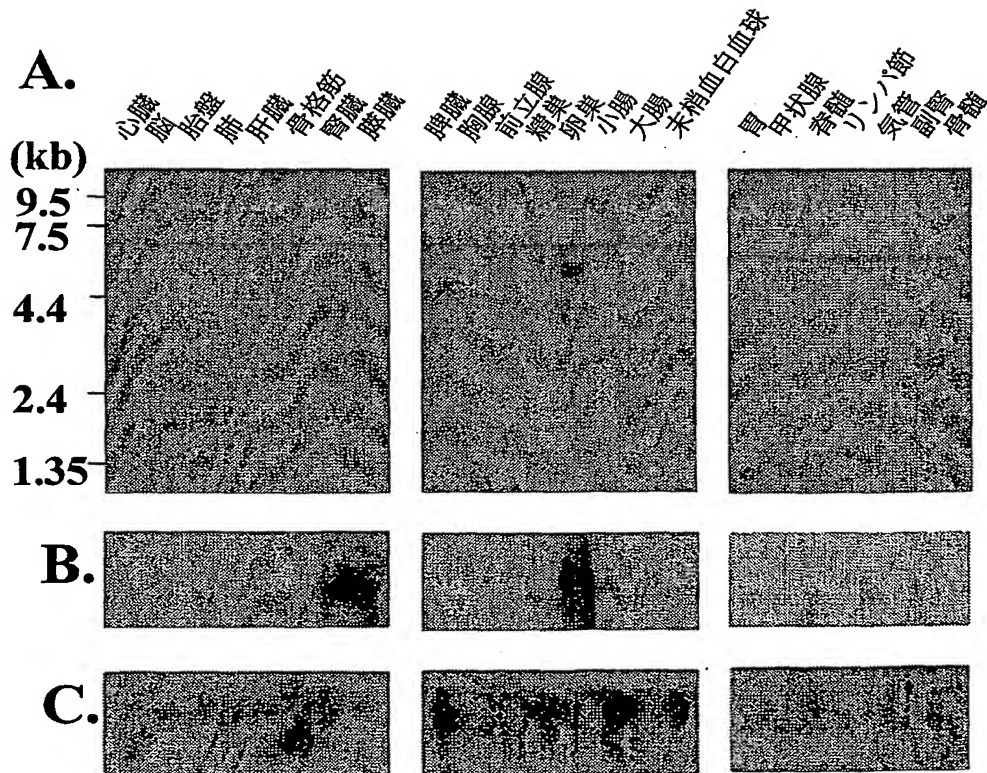
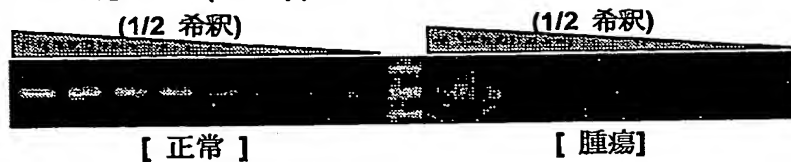


図 5

&lt; PJ01256 遺伝子 (505 bp) &gt;



&lt; G3PDH 遺伝子 (452 bp) &gt;

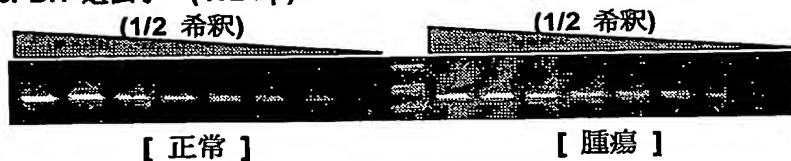
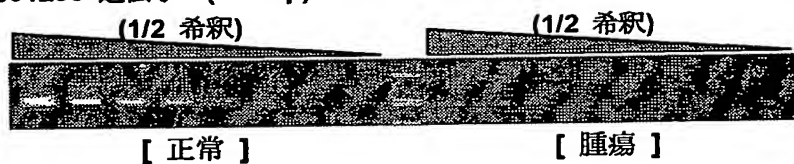


図 6

&lt; PJ01256 遺伝子 (505 bp) &gt;



&lt; G3PDH 遺伝子 (452 bp) &gt;

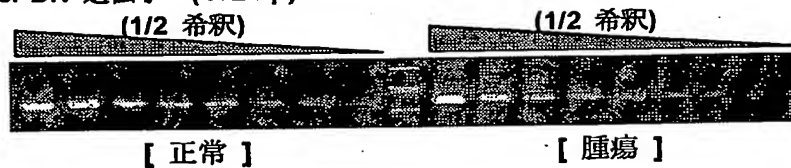
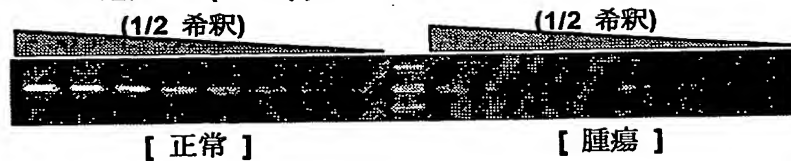
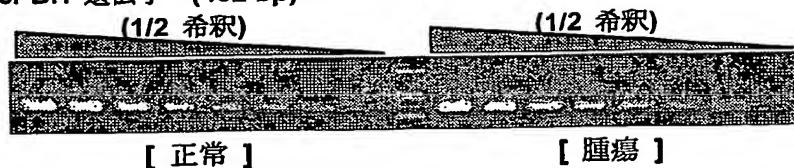


図 7

&lt; PJ01256 遺伝子 (505 bp) &gt;



&lt; G3PDH 遺伝子 (452 bp) &gt;



8

Human MEKGEYDLVSAYEVDHRGDYVSHEIMHHQRRRRRAVAVSEVESLHLRLKGSRHDFHVDLRTSSSLVAPGF  
Human VQTLGKTGKTSVQTLPPEDFCFYQGSLRSHRNSSVALSTCQGLSGMIRTEEADYFLRPLPSHLSWKLGRA  
Human AQQSSPSHVLTKRSTEPHAPGASEVLVTSRTWELAHQPLHSSDLRLGLPQKQHFQGRKKYMPQPPKEDL  
Human FILPDEYKSCLRHKRSLLRYHRNEELNVETLVVVDKMMQNHGHENITTYVLTILNMVSALFKDGTIGGN  
Human INIAIVGLILLEDEQPLVISHHADHTLSSFCQWQSGLMGKDGTNRDHAILLTGDLCSWKNEPCDTLGF  
Human APISGMCSKYRSCTINEDTGLGLAFTIAHESGHNFQMIHDGEGNMCKKSEGNIMSPTLAGRNGVFSWSPC  
Human SRQYLHKFLS

Human TAQAICLADQPKPVKEYKYPEKLPGELYDANTQCKWQFGEKAKLCMLDFKKDICKALWCHRIGRKOETKF  
|||||  
Mouse TAQAICLADQPKPVKEYKYPEKLPGLYDANTQCKWQFGEKAKLCMLDFRKDICKALWCHRIGRKOETKF

Human MPAAEGTICGHDMWCRGGQCVKYGDEGPKPTHGHWSWSSWSPCSRTCGGGVSHRSRLCTNPKPSHGGKF  
|||||  
Mouse MPAAEGTLCGHDMWCRGGQCVKYGDEGPKPTHGHWSWSPWSPCSRTCGGGISHRERLCTNPRPSHGGKF

Human CEGSTRTLKLCNSQKCPRDSVDFRAAQCAEHNSRRFRGRHYKWKPYTQVEDQDLCKLYCIAEGDFFFFSL  
Human SNKVKDGTPCSEDSRNVCIDGICERVGCDNVLGSDAVEDVCGVCNGNNSACTIHRGLYTKHHHTNQYYHM  
Human VTIPSGARSIRIYEMNVSTSYISVRNALRRYYLNHWTVDWPGRYKFSGTTFDYRRSYNEPENLIATGPT  
Human NETLIVELLFQGRNPGVAWEYSMPRLGTEKQPPAQPSYTWAIVRSECSVSCGGGQMTVREGCYRDLKFQV  
Human NMSFCNPKTRPVTGLVPCKVSACPPSWSVGNWSACSRTCAGGGAQSRPVQCTRRVHYDSEPVASLCPQPA  
Human PSSRQACNSQSCPPAWSAGPWAECSTCGKGWRKRAVACKSTNPSARAQLLPDAVCTSEPKPRMHEACLL  
Human QRCHKPKKLQWLVSWSQCSVTGERGTQKRFLKCAEKYVSGKYRELASKKCSHLPKPSLELERACAPLPC  
Human PRHPPFAAAGPSRGSWFASPWSQCTASCAGGVQTRSVQCLAGGRPASGCLLHQKPSASLACNTHFCPIAE  
Human KKDAFCKDYFHWCYLVPQHGMCSHKFYGKQCKTCSKSNL

[X] 9

Human MEKGEYDLVSAYEVDHRGDYVSHEIMHHQRRRRRAVAVSEVESLHLRLKGSRHDFHVDLRTSSSLVAPGF  
Human VQTLGKTGTSVQTLPPEDFCFYQGSLSRSHRNSSVALSTCQGLSGMIRTEEADYFLRPLPSHLSWKLGRA  
Human AQQSSPSHVLYKRSTEPHAPGASEVLVTSRTWELAHQPLHSSDLRLGLPQKQHFCGRRKKYMPQPPKEDL  
Human FILPDEYKSCLRHKRSLLRYHRNEELNVETLVVVDKMMQNHGHENITTYVLTILNMVSALFKDGTIGGN  
Human INIAIVGLILLEDEQPGLVISHHADHTLSSFCQWQSGLMGKDGTRHDHAILLTGLDCSWKNEPCDTLGF  
Human APISGMCSKYRSCTINEDTGLGLAFTIAHESGHNFMIHDGEGNM

Human CKKSEGNIMSPTLAGRNGVFSWSPCSRQYLHKFLSTAQAICLADQPKPVKEYKYPEKLPGELYDANTQCK  
|||||  
Mouse CKKSEGNIMSPTLAGRNGVFSWSSCSRQYLHKFLSTAQAICLADQPKPVKEYKYPEKLPGELYDANTQCK

Human WQFGEKAKLCMLDFKDKICKALWCHIRGRKCETKFMPAAEGTCGHDMWCRGGQCVKYGDEGPKPTHGHW  
|||||  
Mouse WQFGEKAKLCMLDFRDKICKALWCHIRGRKCETKFMPAAEGTLGGQDMWCRGGQCVKYGDEGPKPTHGHW

Human SDWSSWSPCSRTCAGGGVSHRSRLCTNPKPSHGKGF  
|||  
Mouse SDWSPWSPCSRTCAGGGISHRERLCTNPRPSHGKGF

Human CEGSTRTLKLNSQKCPRDSVDFRAAQCAEHNSRRFRGRHYKWKPYTQVEDQDLCKLYCIAEGDFFFFSL  
Human SNKVKGDTPCSEDSRNVCDGICERVGCDNVLGSDAVEDVCGVCNGNNSACTIHRGLYTKHHHTNQYYHM  
Human VTIPSGARSIRIYEMNVSTSYISVRNALRRYYLNGHWTVDWPGRYKFSGTTFDYRRSYNEPENLIATGPT  
Human NETLIVELLFQGRNPGVAWEYSMPRLGTEKQPPAQPSYTWAVRSECSVSCGGGQMTVREGCYRDLKFQV  
Human NMSFCNPKTRPVTGLVPCKVSACPPSWSVGNWSACSRTCAGGGAGSRPVQCTRRVHYDSEVPASLCPQPA  
Human PSSRQACNSQSCPPAWSAGPWAECSTCGKGWRKRAVACKSTNPSARAQLLPDAVCTSEPKPRMHEACLL  
Human QRCHKPKKLQWLVSASQCSVTGERGTQKRFLKCAEKYVSGKYRELASKKCSHLPKPSLELERACAPLPC  
Human PRHPPFAAAGPSRGSWFASPWSQCTASCGGGVQTRSVQCLAGGRPASGCLLHQKPSASLACNTHFCPIAE  
Human KKDAFCKDYFHWCYLVPQHGMCSHKFYGKQCKTCSKSNL

7/13

図 10

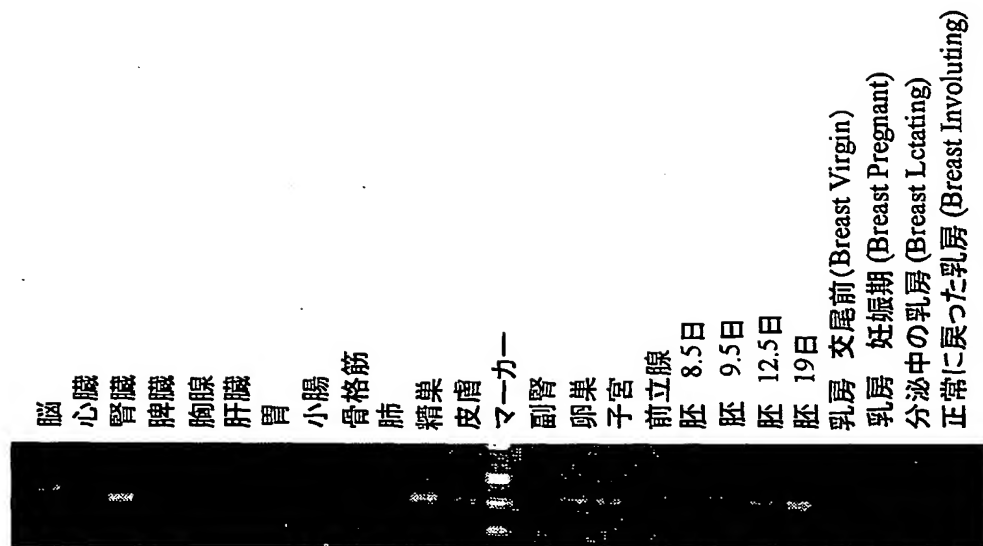


図 11

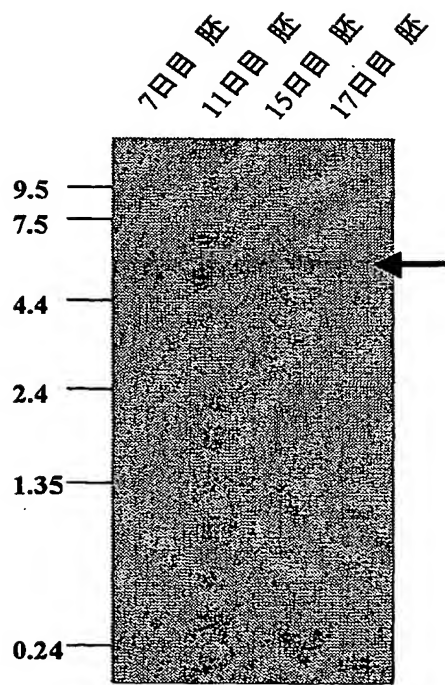


図 1 2

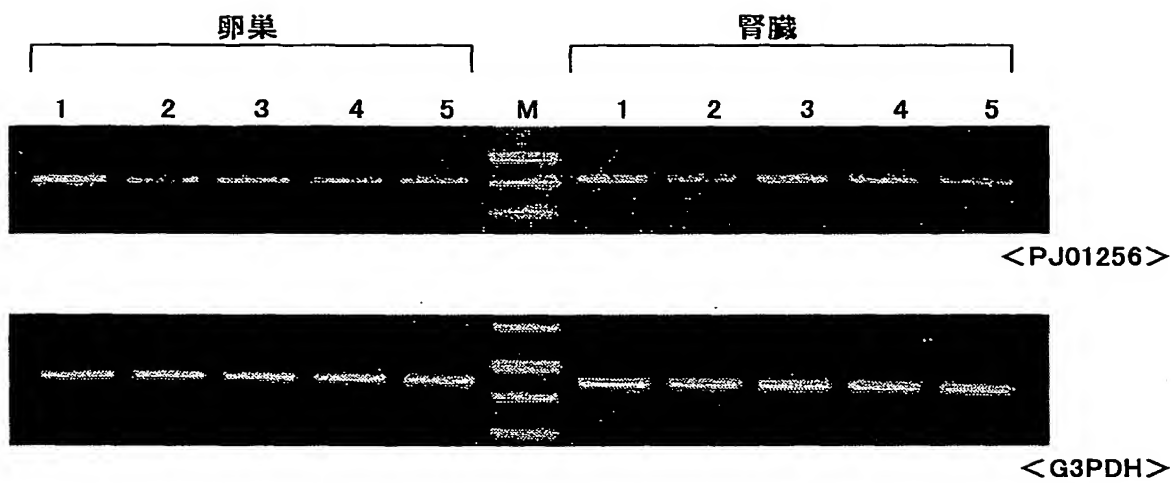
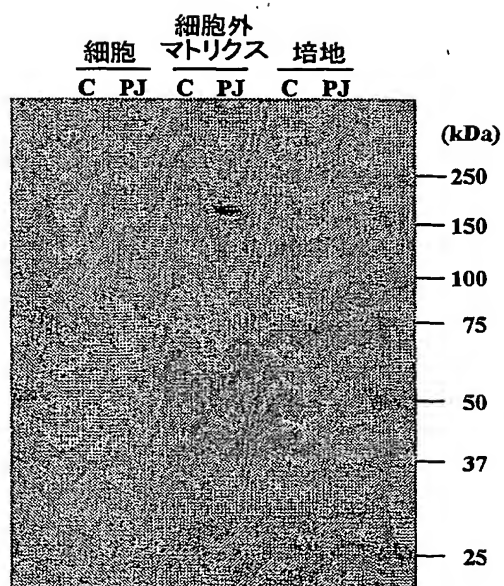
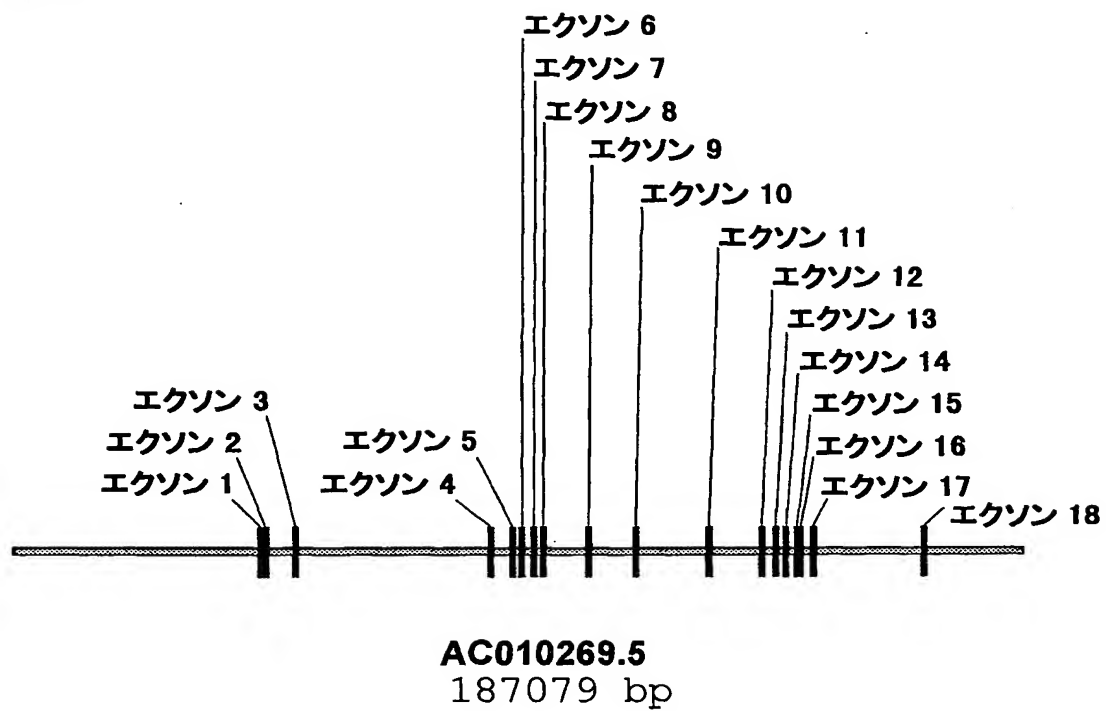


図 1 3



9/13

図 1 4



15

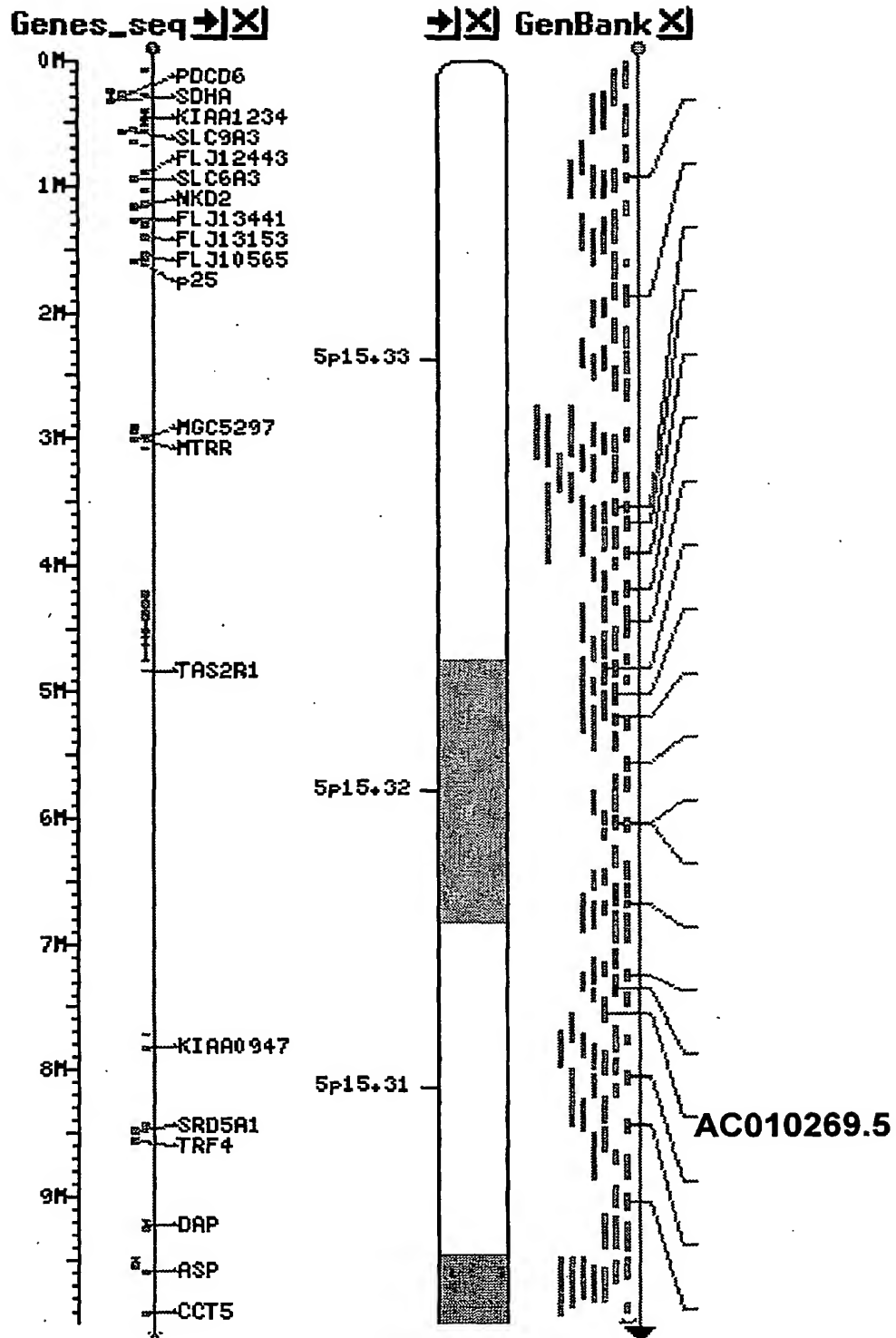


図 16

3889 CCGGAATATTAATAGATCATGGAGATAATTAATGATAAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTT  
*pol-h* プライマー

3961 TTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATTCGGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCG

4033 GATCCCGGTCCGAAGCGCGCGGAATTCAAAGGCCTACGTGAGGAGCTCACTAGTCGCGGCCGCTTTCGAAT  
*Bam*HI *Bss*HI *Eco*RI *Stu*I *Sa*I *Sac*I *Spe*I *Not*I *Asu*II

E Q K L I S E E D L N

4105 CTAGAGCCTGCAGTCTCGAGG CATGCGGTACCAAGCTTGAACAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATA  
*Xba*I *Pst*I *Xho*I *Sph*I *Kpn*I *Hind*III

S A V D H H H H H \*

4177 GCGCCGTCGACCATCATCATCATCATTGAGAGCT TGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATA  
*Sa*II *Sca*I

4249 CCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGA

図 17

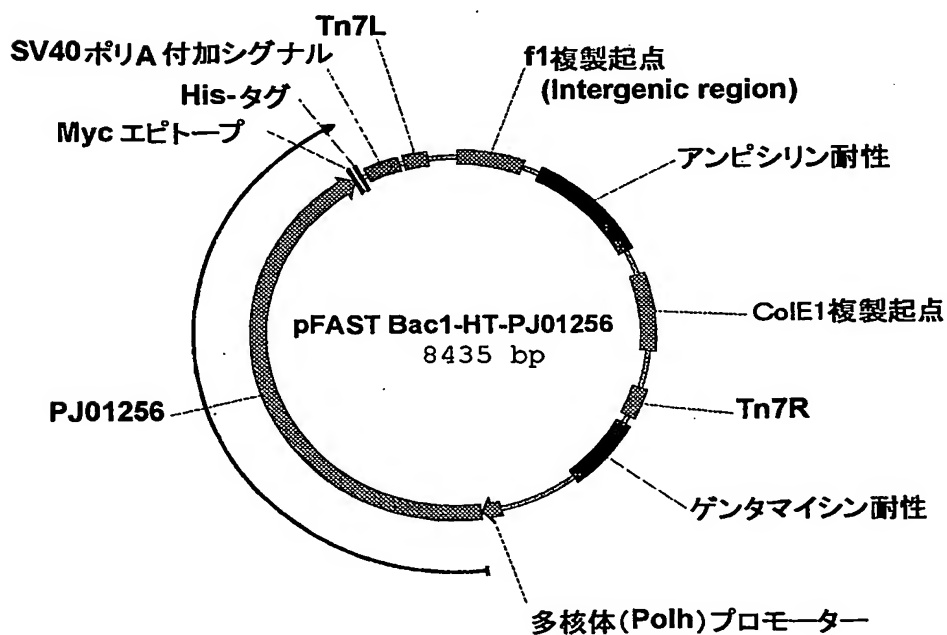


図 1 8

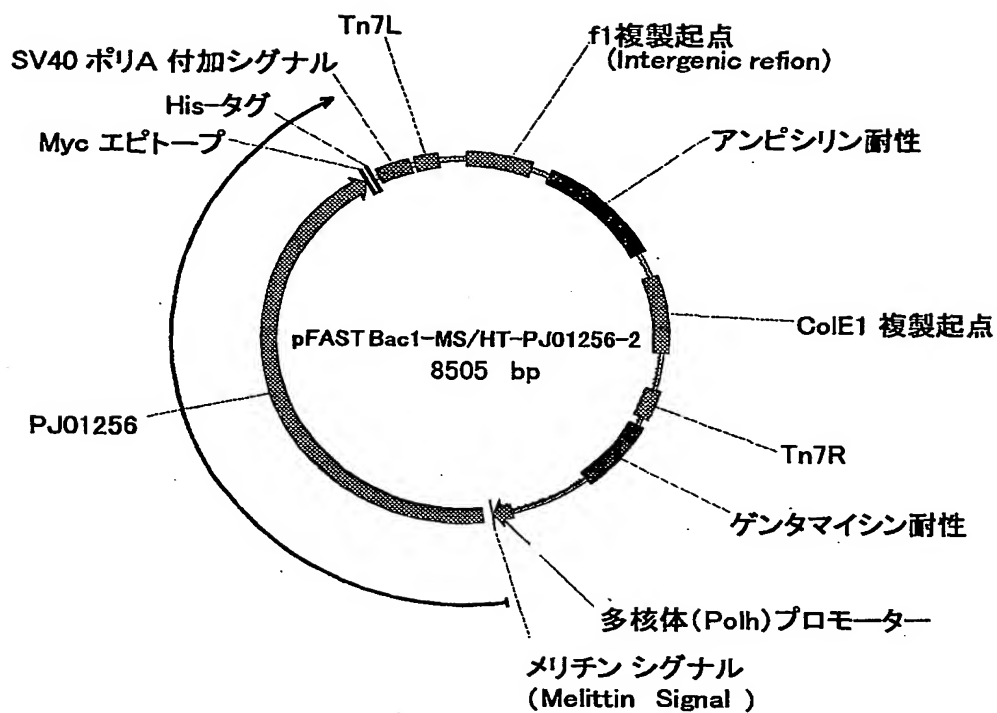
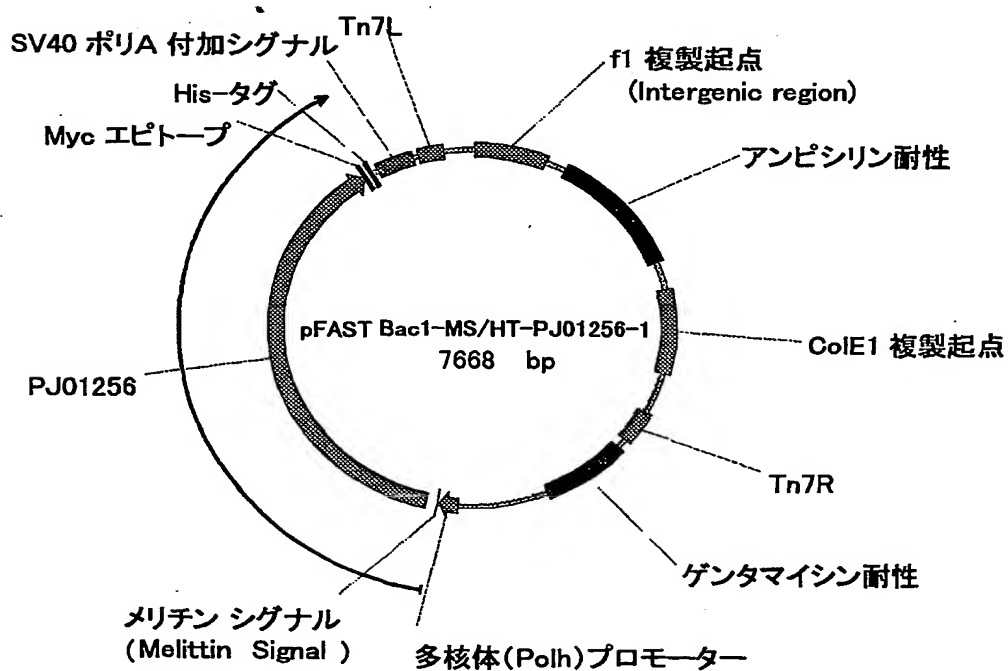
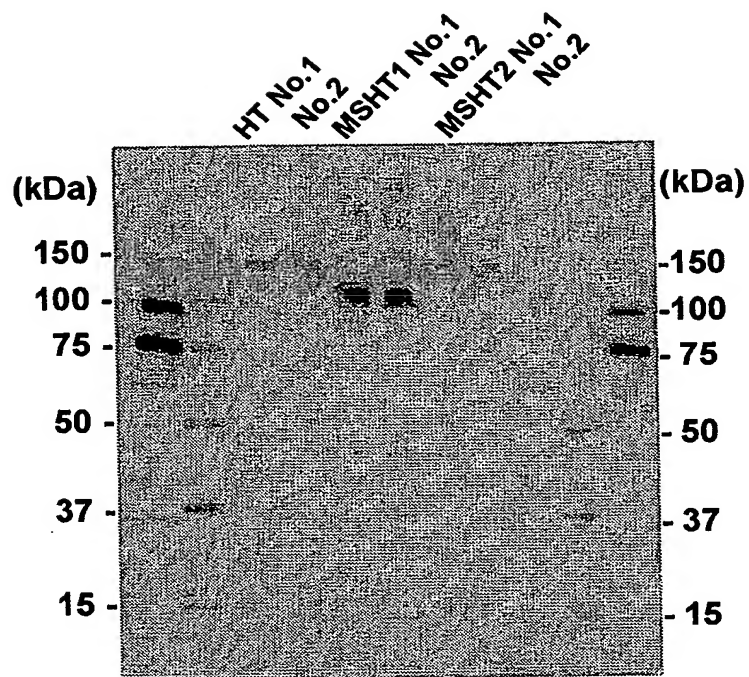


図 1 9



13/13

20



1/45

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; WELFIDE CORPORATION

KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE

<120> A novel ADAMTS family polypeptide and the gene coding  
it

&lt;130&gt; GP01-1035

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP P2000-311309

&lt;151&gt; 2000-10-11

&lt;150&gt; JP P2001-102905

&lt;151&gt; 2001-04-02

&lt;160&gt; 11

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1021

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

Leu Tyr Lys Arg Ser Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val
 1           5           10           15
Leu Val Thr Ser Arg Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser
          20           25           30
Ser Asp Leu Arg Leu Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg
          35           40           45
Arg Lys Lys Tyr Met Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu
          50           55           60

```

2/45

Pro Asp Glu Tyr Lys Ser Cys Leu Arg His Lys Arg Ser Leu Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Tyr His Arg Asn Glu Glu Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Val Asp  
 85 90 95  
 Lys Lys Met Met Gln Asn His Gly His Glu Asn Ile Thr Thr Tyr Val  
 100 105 110  
 Leu Thr Ile Leu Asn Met Val Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile  
 115 120 125  
 Gly Gly Asn Ile Asn Ile Ala Ile Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu Asp  
 130 135 140  
 Glu Gln Pro Gly Leu Val Ile Ser His His Ala Asp His Thr Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Cys Gln Trp Gln Ser Gly Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr Arg  
 165 170 175  
 His Asp His Ala Ile Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp Lys  
 180 185 190  
 Asn Glu Pro Cys Asp Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys  
 195 200 205  
 Ser Lys Tyr Arg Ser Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu  
 210 215 220  
 Ala Phe Thr Ile Ala His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His  
 225 230 235 240  
 Asp Gly Glu Gly Asn Met Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser  
 245 250 255  
 Pro Thr Leu Ala Gly Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser  
 260 265 270  
 Arg Gln Tyr Leu His Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu  
 275 280 285  
 Ala Asp Gln Pro Lys Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu  
 290 295 300  
 Pro Gly Glu Leu Tyr Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly  
 305 310 315 320  
 Glu Lys Ala Lys Leu Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys  
 325 330 335  
 Ala Leu Trp Cys His Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met  
 340 345 350  
 Pro Ala Ala Glu Gly Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly

3/45

355		360		365
Gly Gln Cys Val Lys Tyr	Gly Asp Glu Gly Pro Lys	Pro Thr His Gly		
370	375	380		
His Trp Ser Asp Trp Ser	Trp Ser Pro Cys Ser	Arg Thr Cys Gly		
385	390	395	400	
Gly Gly Val Ser His Arg	Ser Arg Leu Cys Thr	Asn Pro Lys Pro Ser		
405	410	415		
His Gly Gly Lys Phe Cys	Glu Gly Ser Thr Arg	Thr Leu Lys Leu Cys		
420	425	430		
Asn Ser Gln Lys Cys Pro	Arg Asp Ser Val Asp	Phe Arg Ala Ala Gln		
435	440	445		
Cys Ala Glu His Asn Ser	Arg Arg Phe Arg Gly	Arg His Tyr Lys Trp		
450	455	460		
Lys Pro Tyr Thr Gln Val	Glu Asp Gln Asp Leu	Cys Lys Leu Tyr Cys		
465	470	475	480	
Ile Ala Glu Gly Phe Asp	Phe Phe Phe Ser Leu	Ser Asn Lys Val Lys		
485	490	495		
Asp Gly Thr Pro Cys Ser	Glu Asp Ser Arg Asn	Val Cys Ile Asp Gly		
500	505	510		
Ile Cys Glu Arg Val Gly	Cys Asp Asn Val Leu	Gly Ser Asp Ala Val		
515	520	525		
Glu Asp Val Cys Gly Val	Cys Asn Gly Asn Asn	Ser Ala Cys Thr Ile		
530	535	540		
His Arg Gly Leu Tyr Thr	Lys His His His Thr	Asn Gln Tyr Tyr His		
545	550	555	560	
Met Val Thr Ile Pro Ser	Gly Ala Arg Ser Ile	Arg Ile Tyr Glu Met		
565	570	575		
Asn Val Ser Thr Ser Tyr	Ile Ser Val Arg Asn	Ala Leu Arg Arg Tyr		
580	585	590		
Tyr Leu Asn Gly His Trp	Thr Val Asp Trp Pro	Gly Arg Tyr Lys Phe		
595	600	605		
Ser Gly Thr Thr Phe Asp	Tyr Arg Arg Ser Tyr	Asn Glu Pro Glu Asn		
610	615	620		
Leu Ile Ala Thr Gly Pro	Thr Asn Glu Thr Leu	Ile Val Glu Leu Leu		
625	630	635	640	
Phe Gln Gly Arg Asn Pro	Gly Val Ala Trp Glu	Tyr Ser Met Pro Arg		
645	650	655		

4/45

Leu Gly Thr Glu Lys Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala  
 660 665 670  
 Ile Val Arg Ser Glu Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met Thr  
 675 680 685  
 Val Arg Glu Gly Cys Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser  
 690 695 700  
 Phe Cys Asn Pro Lys Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys  
 705 710 715 720  
 Val Ser Ala Cys Pro Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys  
 725 730 735  
 Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr  
 740 745 750  
 Arg Arg Val His Tyr Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro  
 755 760 765  
 Gln Pro Ala Pro Ser Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro  
 770 775 780  
 Pro Ala Trp Ser Ala Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly  
 785 790 795 800  
 Lys Gly Trp Arg Lys Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser  
 805 810 815  
 Ala Arg Ala Gln Leu Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys  
 820 825 830  
 Pro Arg Met His Glu Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys  
 835 840 845  
 Lys Leu Gln Trp Leu Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys  
 850 855 860  
 Glu Arg Gly Thr Gln Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val  
 865 870 875 880  
 Ser Gly Lys Tyr Arg Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro  
 885 890 895  
 Lys Pro Ser Leu Glu Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro  
 900 905 910  
 Arg His Pro Pro Phe Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe  
 915 920 925  
 Ala Ser Pro Trp Ser Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Gly Val Gln  
 930 935 940  
 Thr Arg Ser Val Gln Cys Leu Ala Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys

5/45

945                      950                      955                      960  
 Leu Leu His Gln Lys Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe  
                          965                      970                      975  
 Cys Pro Ile Ala Glu Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His  
                          980                      985                      990  
 Trp Cys Tyr Leu Val Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr  
                          995                      1000                      1005  
 Gly Lys Gln Cys Cys Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu  
                          1010                      1015                      1020

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 4234

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (3)..(3068)

&lt;400&gt; 2

ta ctg tac aag aga tcc aca gag ccc cat gct cct ggg gcc agt gag    47  
   Leu Tyr Lys Arg Ser Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu  
       1                      5                      10                      15  
  
 gtc ctg gtg acc tca agg aca tgg gag ctg gca cat caa ccc ctg cac    95  
 Val Leu Val Thr Ser Arg Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His  
                          20                      25                      30  
  
 agc agc gac ctt cgc ctg gga ctg cca caa aag cag cat ttc tgt gga    143  
 Ser Ser Asp Leu Arg Leu Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly  
                          35                      40                      45  
  
 aga cgc aag aaa tac atg ccc cag cct ccc aag gaa gac ctc ttc atc    191  
 Arg Arg Lys Lys Tyr Met Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile  
                          50                      55                      60

6/45

ttg cca gat gag tat aag tct tgc tta cgg cat aag cgc tct ctt ctg	239
Leu Pro Asp Glu Tyr Lys Ser Cys Leu Arg His Lys Arg Ser Leu Leu	
65 70 75	
agg tac cat aga aat gaa gaa ctg aac gtg gag acc ttg gtg gtg gtc	287
Arg Tyr His Arg Asn Glu Glu Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Val	
80 85 90 95	
gac aaa aag atg atg caa aac cat ggc cat gaa aat atc acc acc tac	335
Asp Lys Lys Met Met Gln Asn His Gly His Glu Asn Ile Thr Thr Tyr	
100 105 110	
gtg ctc acg ata ctc aac atg gta tct gct tta ttc aaa gat gga aca	383
Val Leu Thr Ile Leu Asn Met Val Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr	
115 120 125	
ata gga gga aac atc aac att gca att gta ggt ctg att ctt cta gaa	431
Ile Gly Gly Asn Ile Asn Ile Ala Ile Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu	
130 135 140	
gat gaa cag cca gga ctg gtg ata agt cac cac gca gac cac acc tta	479
Asp Glu Gln Pro Gly Leu Val Ile Ser His His Ala Asp His Thr Leu	
145 150 155	
agt agc ttc tgc cag tgg cag tct gga ttg atg ggg aaa gat ggg act	527
Ser Ser Phe Cys Gln Trp Gln Ser Gly Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr	
160 165 170 175	
cgt cat gac cac gcc atc tta ctg act ggt ctg gat ata tgt tcc tgg	575
Arg His Asp His Ala Ile Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp	
180 185 190	
aag aat gag ccc tgt gac act ttg gga ttt gca ccc ata agt gga atg	623
Lys Asn Glu Pro Cys Asp Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met	
195 200 205	

7/45

tgt agt aaa tat cgc agc tgc acg att aat gaa gat aca ggt ctt gga	671
Cys Ser Lys Tyr Arg Ser Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly	
210 215 220	
ctg gcc ttc acc att gcc cat gag tct gga cac aac ttt ggc atg att	719
Leu Ala Phe Thr Ile Ala His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile	
225 230 235	
cat gat gga gaa ggg aac atg tgc aaa aag tcc gag ggc aac atc atg	767
His Asp Gly Glu Gly Asn Met Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met	
240 245 250 255	
tcc cct aca ttg gca gga cgc aat gga gtc ttc tcc tgg tca ccc tgc	815
Ser Pro Thr Leu Ala Gly Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys	
260 265 270	
agc cgc cag tat cta cac aaa ttt cta agc acc gct caa gct atc tgc	863
Ser Arg Gln Tyr Leu His Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys	
275 280 285	
ctt gct gat cag cca aag cct gtg aag gaa tac aag tat cct gag aaa	911
Leu Ala Asp Gln Pro Lys Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys	
290 295 300	
ttg cca gga gaa tta tat gat gca aac aca cag tgc aag tgg cag ttc	959
Leu Pro Gly Glu Leu Tyr Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe	
305 310 315	
gga gag aaa gcc aag ctc tgc atg ctg gac ttt aaa aag gac atc tgt	1007
Gly Glu Lys Ala Lys Leu Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys	
320 325 330 335	
aaa gcc ctg tgg tgc cat cgt att gga agg aaa tgt gag act aaa ttt	1055
Lys Ala Leu Trp Cys His Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe	
340 345 350	
atg cca gca gca gaa ggc aca att tgt ggg cat gac atg tgg tgc cgg	1103

8/45

Met Pro Ala Ala Glu Gly Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg	
355 360 365	
gga gga cag tgt gtg aaa tat ggt gat gaa ggc ccc aag ccc acc cat	1151
Gly Gly Gln Cys Val Lys Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His	
370 375 380	
ggc cac tgg tcg gac tgg tct tct tgg tcc cca tgc tcc agg acc tgc	1199
Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys	
385 390 395	
gga ggg gga gta tct cat agg agt cgc ctc tgc acc aac ccc aag cca	1247
Gly Gly Gly Val Ser His Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro	
400 405 410 415	
tcg cat gga ggg aag ttc tgt gag ggc tcc act cgc act ctg aag ctc	1295
Ser His Gly Gly Lys Phe Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu	
420 425 430	
tgc aac agt cag aaa tgt ccc cgg gac agt gtt gac ttc cgt gct gct	1343
Cys Asn Ser Gln Lys Cys Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala	
435 440 445	
cag tgt gcc gag cac aac agc aga cga ttc aga ggg cgg cac tac aag	1391
Gln Cys Ala Glu His Asn Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys	
450 455 460	
tgg aag cct tac act caa gta gaa gat cag gac tta tgc aaa ctc tac	1439
Trp Lys Pro Tyr Thr Gln Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr	
465 470 475	
tgt atc gca gaa gga ttt gat ttc ttc ttt tct ttg tca aat aaa gtc	1487
Cys Ile Ala Glu Gly Phe Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val	
480 485 490 495	
aaa gat ggg act cca tgc tcg gag gat agc cgt aat gtt tgt ata gat	1535
Lys Asp Gly Thr Pro Cys Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp	

9/45

500	505	510	
ggg ata tgt gag aga gtt gga tgt gac aat gtc ctt gga tct gat gct			1583
Gly Ile Cys Glu Arg Val Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala			
515	520	525	
gtt gaa gac gtc tgt ggg gtg tgt aac ggg aat aac tca gcc tgc acg			1631
Val Glu Asp Val Cys Gly Val Cys Asn Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr			
530	535	540	
att cac agg ggt ctc tac acc aag cac cac cac acc aac cag tat tat			1679
Ile His Arg Gly Leu Tyr Thr Lys His His His Thr Asn Gln Tyr Tyr			
545	550	555	
cac atg gtc acc att cct tct gga gcc cgg agt atc cgc atc tat gaa			1727
His Met Val Thr Ile Pro Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu			
560	565	570	575
atg aac gtc tct acc tcc tac att tct gtg cgc aat gcc ctc aga agg			1775
Met Asn Val Ser Thr Ser Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg			
580	585	590	
tac tac ctg aat ggg cac tgg acc gtg gac tgg ccc ggc cgg tac aaa			1823
Tyr Tyr Leu Asn Gly His Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys			
595	600	605	
ttt tcg ggc act act ttc gac tac aga cgg tcc tat aat gag ccc gag			1871
Phe Ser Gly Thr Thr Phe Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu			
610	615	620	
aac tta atc gct act gga cca acc aac gag aca ctg att gtg gag ctg			1919
Asn Leu Ile Ala Thr Gly Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu			
625	630	635	
ctg ttt cag gga agg aac ccg ggt gtt gcc tgg gaa tac tcc atg cct			1967
Leu Phe Gln Gly Arg Asn Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro			
640	645	650	655



11/45

ggg aag ggg tgg agg aag cgg gca gtg gcc tgt aag agc acc aac ccc 2447  
 Gly Lys Gly Trp Arg Lys Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro  
 800 805 810 815

tcg gcc aga gcg cag ctg ctg ccc gac gct gtc tgc acc tcc gag ccc 2495  
 Ser Ala Arg Ala Gln Leu Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro  
 820 825 830

aag ccc agg atg cat gaa gcc tgt ctg ctt cag cgc tgc cac aag ccc 2543  
 Lys Pro Arg Met His Glu Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro  
 835 840 845

aag aag ctg cag tgg ctg gtg tcc gcc tgg tcc cag tgc tct gtg aca 2591  
 Lys Lys Leu Gln Trp Leu Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr  
 850 855 860

tgt gaa aga gga aca cag aaa aga ttc tta aaa tgt gct gaa aag tat 2639  
 Cys Glu Arg Gly Thr Gln Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr  
 865 870 875

gtt tct gga aag tat cga gag ctg gcc tca aag aag tgc tca cat ttg 2687  
 Val Ser Gly Lys Tyr Arg Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu  
 880 885 890 895

ccg aag ccc agc ctg gag ctg gaa cgt gcc tgc gcc ccg ctt cca tgc 2735  
 Pro Lys Pro Ser Leu Glu Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys  
 900 905 910

ccc agg cac ccc cca ttt gct gct gcg gga ccc tcg agg ggc agc tgg 2783  
 Pro Arg His Pro Pro Phe Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp  
 915 920 925

ttt gcc tca ccc tgg tct cag tgc acg gcc agc tgt ggg gga ggc gtt 2831  
 Phe Ala Ser Pro Trp Ser Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Gly Val  
 930 935 940

cag acg agg tcc gtg cag tgc ctg gct ggg ggc cgg ccg gcc tca ggc 2879

12/45

Gln Thr Arg Ser Val	Gln Cys Leu Ala Gly	Gly Arg Pro Ala Ser Gly	
945	950	955	

tgc ctc ctg cac cag aag cct tcg gcc tcc ctg gcc tgc aac act cac 2927  
 Cys Leu Leu His Gln Lys Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His  
 960 965 970 975

ttc tgc ccc att gca gag aag aaa gat gcc ttc tgc aaa gac tac ttc 2975  
 Phe Cys Pro Ile Ala Glu Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe  
 980 985 990

cac tgg tgc tac ctg gta ccc cag cac ggg atg tgc agc cac aag ttc 3023  
 His Trp Cys Tyr Leu Val Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe  
 995 1000 1005

tac ggc aag cag tgc tgc aag act tgc tct aag tcc aac ttg tga 3068  
 Tyr Gly Lys Gln Cys Cys Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu  
 1010 1015 1020

gttgggaccg ctctccgtag cagagaaagt gcctgcgtgg cacagaaatt tcccacaaat 3128  
 gagctgtgca atctacgtcg gaatacatcc aaggaagagc aaagccaaaa gaagaaaacc 3188  
 gtgttaggct ctttgaccag gagtgtatgt atgtgtttca ctgtgagcct gggtgcagac 3248  
 ctgtgtcccc atgcacacag tgtctcctgt caggctgaaa tgtggcaccc tggcagacag 3308  
 agctgtggct cgtgaggcag aaggcaggca ccacaacggg agaggcagca ctcacccttg 3368  
 cctgttgtag ctaaatcaag tcaaaaagac aggcgaggct gaacttgcta aatgtctggt 3428  
 gccttagaaa aagaaggaaa ggccatgaaa taaggaaaac atacaaaata tgtacccctt 3488  
 agttcaccag cctcccctcc cactaggagg gccctcgag ccatcaggag tgaccaactt 3548  
 cctgggtgga ggtcaggga gctccaggag gctgccagg ctctctctcc tctctcccag 3608

13/45

cggccgagca tctcttacca ggaacctgga gccaccgccg gagccagcgt catctctagg 3668  
gtcactggcc aggggactgc attctggttt gggactttgc ctatggaaat gggaaaaatg 3728  
aaattcctgc taaggctgtt ctatctcttt cagattcatg cattgaagga gagatttttt 3788  
atactttatg ttttatcttt ctcagttatt tgcaagttag tgtcctttta aaaacacact 3848  
tcttcatgct tttctttgta aatgacagat cgaagtatag gttacatcaa aacctacca 3908  
tcctgagaag agttatggtt ctattatagc agacgtcagc cacacagcct atgtgacaat 3968  
aaccttagag tcctgtgttt tgtttttggtg tgttgtgaga ttttaacttt ttttttttcg 4028  
gtgagtctgg ccatttctat aatgccaggt gggaagccag gctgcgggtg ttaggggtggg 4088  
aatctgcccg gcgtctctgg caccctccct gccatcctca gtgcggctgc tgttctcctg 4148  
tccggtgctg tggtccatt ccaaaggggc acctggatat ttatatattgc tgaagtttta 4208  
taataaagtt tatatgttac agtgtg 4234

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 5610

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (770)..(4444)

&lt;400&gt; 3

cgcaactcc agagcgaggc acgcgccttt aaaggcaggt ccgcggctct cccacgtcct 60

ggcgcccggt ttccgcacc cagtgtcccc acagctgtgc ccgggcacag aggcgcggcc 120

14/45

agaccgcact ccgcgggctg cagggtgtccc ggcctctggc ggcgccggtg cggcccggag 180  
 gtgggagccc ggggagccac tgcagtagct ggagtccgc cgagtcccca gcccgaaggc 240  
 agggcaggag cgcgcaccgg ccggagggtc atgtgagca tgcgccgcgc cggtgcccg 300  
 cagcctctcc aactgtgtgg tccccgcgc ggcagagagg cacggactgc aggccgtggg 360  
 cagctccatc ttcccgctc ctctctctct ggcgtgccc gctgtctccc gccttcctc 420  
 tgctccccgc tcgctccgc ctccagccc cgctgacct gcctcctccc ctctgtctt 480  
 tgtccctgca ctctccctc ctggctctc tgaccccccc gccctacct cctccctcc 540  
 ttcttccct gcccgcccc cgcttccca ccgtccgcgc cgcgccgcc gcccggtg 600  
 cactccgcc ccccgcccg cacggagctt cagtaataac cccggcgcg cggcggagt 660  
 gctgtgggga atcctccgc gctctgctg gtcgggtcc tccctgccg ctgcacgt 720  
 gccggccggg gaccctccg tggccctag cccctcgag cgctcctg atg aag ccc 778

Met Lys Pro

1

cgc gcg cgc gga tgg cgg ggc ttg gcg gcg ctg tgg atg ctg ctg gcg 826  
 Arg Ala Arg Gly Trp Arg Gly Leu Ala Ala Leu Trp Met Leu Leu Ala

5

10

15

cag gtg gcc gag cag gca cct gcg tgc gcc atg gga ccc gca gcg gca 874  
 Gln Val Ala Glu Gln Ala Pro Ala Cys Ala Met Gly Pro Ala Ala Ala

20

25

30

35

gcg cct ggg agc ccg agc gtc ccg cgt cct cct cca ccc gcg gag cgg 922  
 Ala Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Pro Pro Pro Pro Ala Glu Arg

40

45

50

ccg ggc tgg atg gaa aag ggc gaa tat gac ctg gtc tct gcc tac gag 970

15/45

Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser Ala Tyr Glu	
55 60 65	
gtt gac cac agg ggc gat tac gtg tcc cat gaa atc atg cac cat cag	1018
Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met His His Gln	
70 75 80	
cgg cgg aga aga gca gtg gcc gtg tcc gag gtt gag tct ctt cac ctt	1066
Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser Leu His Leu	
85 90 95	
cgg ctg aaa ggc ccc agg cac gac ttc cac atg gat ctg agg act tcc	1114
Arg Leu Lys Gly Pro Arg His Asp Phe His Met Asp Leu Arg Thr Ser	
100 105 110 115	
agc agc cta gtg gct cct ggc ttt att gtg cag acg ttg gga aag aca	1162
Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu Gly Lys Thr	
120 125 130	
ggc act aag tct gtg cag act tta ccg cca gag gac ttc tgt ttc tat	1210
Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe Cys Phe Tyr	
135 140 145	
caa ggc tct ttg cga tca cac aga aac tcc tca gtg gcc ctt tca acc	1258
Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala Leu Ser Thr	
150 155 160	
tgc caa ggc ttg tca ggc atg ata cga aca gaa gag gca gat tac ttc	1306
Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala Asp Tyr Phe	
165 170 175	
cta agg cca ctt cct tca cac ctc tca tgg aaa ctc ggc aga gct gcc	1354
Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly Arg Ala Ala	
180 185 190 195	
caa ggc agc tcg cca tcc cac gta ctg tac aag aga tcc aca gag ccc	1402
Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser Thr Glu Pro	

16/45

200	205	210	
cat gct cct ggg gcc agt gag gtc ctg gtg acc tca agg aca tgg gag			1450
His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg Thr Trp Glu			
215	220	225	
ctg gca cat caa ccc ctg cac agc agc gac ctt cgc ctg gga ctg cca			1498
Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu Gly Leu Pro			
230	235	240	
caa aag cag cat ttc tgt gga aga cgc aag aaa tac atg ccc cag cct			1546
Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met Pro Gln Pro			
245	250	255	
ccc aag gaa gac ctc ttc atc ttg cca gat gag tat aag tct tgc tta			1594
Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys Ser Cys Leu			
260	265	270	275
cgg cat aag cgc tct ctt ctg agg tcc cat aga aat gaa gaa ctg aac			1642
Arg His Lys Arg Ser Leu Leu Arg Ser His Arg Asn Glu Glu Leu Asn			
280	285	290	
gtg gag acc ttg gtg gtg gtc gac aaa aag atg atg caa aac cat ggc			1690
Val Glu Thr Leu Val Val Val Asp Lys Lys Met Met Gln Asn His Gly			
295	300	305	
cat gaa aat atc acc acc tac gtg ctc acg ata ctc aac atg gta tct			1738
His Glu Asn Ile Thr Thr Tyr Val Leu Thr Ile Leu Asn Met Val Ser			
310	315	320	
gct tta ttc aaa gat gga aca ata gga gga aac atc aac att gca att			1786
Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Gly Asn Ile Asn Ile Ala Ile			
325	330	335	
gta ggt ctg att ctt cta gaa gat gaa cag cca gga ctg gtg ata agt			1834
Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu Asp Glu Gln Pro Gly Leu Val Ile Ser			
340	345	350	355

17/45

cac cac gca gac cac acc tta agt agc ttc tgc cag tgg cag tct gga 1882  
 His His Ala Asp His Thr Leu Ser Ser Phe Cys Gln Trp Gln Ser Gly  
                   360                  365                  370

ttg atg ggg aaa gat ggg act cgt cat gac cac gcc atc tta ctg act 1930  
 Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr Arg His Asp His Ala Ile Leu Leu Thr  
                   375                  380                  385

ggt ctg gat ata tgt tcc tgg aag aat gag ccc tgt gac act ttg gga 1978  
 Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu Pro Cys Asp Thr Leu Gly  
                   390                  395                  400

ttt gca ccc ata agt gga atg tgt agt aaa tat cgc agc tgc acg att 2026  
 Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys Tyr Arg Ser Cys Thr Ile  
                   405                  410                  415

aat gaa gat aca ggt ctt gga ctg gcc ttc acc att gcc cat gag tct 2074  
 Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr Ile Ala His Glu Ser  
 420                  425                  430                  435

gga cac aac ttt ggc atg att cat gat gga gaa ggg aac atg tgt aaa 2122  
 Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu Gly Asn Met Cys Lys  
                   440                  445                  450

aag tcc gag ggc aac atc atg tcc cct aca ttg gca gga cgc aat gga 2170  
 Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Ala Gly Arg Asn Gly  
                   455                  460                  465

gtc ttc tcc tgg tca ccc tgc agc cgc cag tat cta cac aaa ttt cta 2218  
 Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His Lys Phe Leu  
                   470                  475                  480

agc acc gct caa gct atc tgc ctt gct gat cag cca aag cct gtg aag 2266  
 Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys Pro Val Lys  
                   485                  490                  495

gaa tac aag tat cct gag aaa ttg cca gga gaa tta tat gat gca aac	2314
Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr Asp Ala Asn	
500 505 510 515	
aca cag tgc aag tgg cag ttc gga gag aaa gcc aag ctc tgc atg ctg	2362
Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu Cys Met Leu	
520 525 530	
gac ttt aaa aag gac atc tgt aaa gcc ctg tgg tgc cat cgt att gga	2410
Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His Arg Ile Gly	
535 540 545	
agg aaa tgt gag act aaa ttt atg cca gca gca gaa ggc aca att tgt	2458
Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly Thr Ile Cys	
550 555 560	
ggg cat gac atg tgg tgc cgg gga gga cag tgt gtg aaa tat ggt gat	2506
Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys Tyr Gly Asp	
565 570 575	
gaa ggc ccc aag ccc acc cat ggc cac tgg tgc gac tgg tct tct tgg	2554
Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Ser Trp	
580 585 590 595	
tcc cca tgc tcc agg acc tgc gga ggg gga gta tct cat agg agt cgc	2602
Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Ser His Arg Ser Arg	
600 605 610	
ctc tgc acc aac ccc aag cca tgc cat gga ggg aag ttc tgt gag ggc	2650
Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro Ser His Gly Gly Lys Phe Cys Glu Gly	
615 620 625	
tcc act cgc act ctg aag ctc tgc aac agt cag aaa tgt ccc cgg gac	2698
Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu Cys Asn Ser Gln Lys Cys Pro Arg Asp	
630 635 640	
agt gtt gac ttc cgt gct gct cag tgt gcc gag cac aac agc aga cga	2746

Ser Val Asp Phe Arg Ala Gln Cys Ala Glu His Asn Ser Arg Arg			
645	650	655	
ttc aga ggg cgg cac tac aag tgg aag cct tac act caa gta gaa gat			2794
Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Trp Lys Pro Tyr Thr Gln Val Glu Asp			
660	665	670	675
cag gac tta tgc aaa ctg tac tgt atc gca gaa gga ttt gat ttc ttc			2842
Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Cys Ile Ala Glu Gly Phe Asp Phe Phe			
680	685	690	
ttt tct ttg tca aat aaa gtc aaa gat ggg act cca tgc tcg gag gat			2890
Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys Ser Glu Asp			
695	700	705	
agc cgt aat gtt tgt ata gat ggg ata tgt gag aga gtt gga tgt gac			2938
Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Glu Arg Val Gly Cys Asp			
710	715	720	
aat gtc ctt gga tct gat gct gtt gaa gac gtc tgt ggg gtg tgt aac			2986
Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala Val Glu Asp Val Cys Gly Val Cys Asn			
725	730	735	
ggg aat aac tca gcc tgc acg att cac agg ggt ctg tac acc aag cac			3034
Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr Ile His Arg Gly Leu Tyr Thr Lys His			
740	745	750	755
cac cac acc aac cag tat tat cac atg gtc acc att cct tct gga gcc			3082
His His Thr Asn Gln Tyr Tyr His Met Val Thr Ile Pro Ser Gly Ala			
760	765	770	
cgg agt atc cgc atc tat gaa atg aac gtc tct acc tcc tac att tct			3130
Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu Met Asn Val Ser Thr Ser Tyr Ile Ser			
775	780	785	
gtg cgc aat gcc ctg aga agg tac tac ctg aat ggg cac tgg acc gtg			3178
Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg Tyr Tyr Leu Asn Gly His Trp Thr Val			

20/45

790	795	800	
gac tgg ccc ggc cgg tac aaa ttt tcg ggc act act ttc gac tac aga			3226
Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Ser Gly Thr Thr Phe Asp Tyr Arg			
805	810	815	
cgg tcc tat aat gag ccc gag aac tta atc gct act gga cca acc aac			3274
Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu Asn Leu Ile Ala Thr Gly Pro Thr Asn			
820	825	830	835
gag aca ctg att gtg gag ctg ctg ttt cag gga agg aac ccg ggt gtt			3322
Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn Pro Gly Val			
840	845	850	
gcc tgg gaa tac tcc atg cct cgc ttg ggg acc gag aag cag ccc cct			3370
Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys Gln Pro Pro			
855	860	865	
gcc cag ccc agc tac act tgg gcc atc gtg cgc tct gag tgc tcc gtg			3418
Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu Cys Ser Val			
870	875	880	
tcc tgc gga ggg gga cag atg acc gtg aga gag ggc tgc tac aga gac			3466
Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys Tyr Arg Asp			
885	890	895	
ctg aag ttt caa gta aat atg tcc ttc tgc aat ccc aag aca cga cct			3514
Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys Thr Arg Pro			
900	905	910	915
gtc acg ggg ctg gtg cct tgc aaa gta tct gcc tgt cct ccc agc tgg			3562
Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro Pro Ser Trp			
920	925	930	
tcc gtg ggg aac tgg agt gcc tgc agt cgg acg tgt ggc ggg ggt gcc			3610
Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Ala			
935	940	945	

cag agc cgc ccc gtg cag tgc aca cgg cgg gtg cac tat gac tcg gag	3658
Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr Asp Ser Glu	
950 955 960	
cca gtc ccg gcc agc ctg tgc cct cag cct gct ccc tcc agc agg cag	3706
Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser Ser Arg Gln	
965 970 975	
gcc tgc aac tct cag agc tgc cca cct gca tgg agc gcc ggg ccc tgg	3754
Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala Gly Pro Trp	
980 985 990 995	
gca gag tgc tca cac acc tgt ggg aag ggg tgg agg aag cgg gca gtg	3802
Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys Arg Ala Val	
1000 1005 1010	
gcc tgt aag agc acc aac ccc tcg gcc aga gcg cag ctg ctg ccc gac	3850
Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser Ala Arg Ala Gln Leu Leu Pro Asp	
1015 1020 1025	
gct gtc tgc acc tcc gag ccc aag ccc agg atg cat gaa gcc tgt ctg	3898
Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys Pro Arg Met His Glu Ala Cys Leu	
1030 1035 1040	
ctt cag cgc tgc cac aag ccc aag aag ctg cag tgg ctg gtg tcc gcc	3946
Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys Lys Leu Gln Trp Leu Val Ser Ala	
1045 1050 1055	
tgg tcc cag tgc tct gtg aca tgt gaa aga gga aca cag aaa aga ttc	3994
Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Glu Arg Gly Thr Gln Lys Arg Phe	
1060 1065 1070 1075	
tta aaa tgt gct gaa aag tat gtt tct gga aag tat cga gag ctg gcc	4042
Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Arg Glu Leu Ala	
1080 1085 1090	

22/45

tca aag aag tgc tca cat ttg ccg aag ccc agc ctg gag ctg gaa cgt 4090  
 Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro Lys Pro Ser Leu Glu Leu Glu Arg  
 1095 1100 1105

gcc tgc gcc ccg ctt cca tgc ccc agg cac ccc cca ttt gct gct gcg 4138  
 Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro Arg His Pro Pro Phe Ala Ala Ala  
 1110 1115 1120

gga ccc tcg agg ggc agc tgg ttt gcc tca ccc tgg tct cag tgc acg 4186  
 Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe Ala Ser Pro Trp Ser Gln Cys Thr  
 1125 1130 1135

gcc agc tgt ggg gga ggc gtt cag acg agg tcc gtg cag tgc ctg gct 4234  
 Ala Ser Cys Gly Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val Gln Cys Leu Ala  
 1140 1145 1150 1155

ggg ggc cgg ccg gcc tca ggc tgc ctc ctg cac cag aag cct tcg gcc 4282  
 Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys Leu Leu His Gln Lys Pro Ser Ala  
 1160 1165 1170

tcc ctg gcc tgc aac act cac ttc tgc ccc att gca gag aag aaa gat 4330  
 Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe Cys Pro Ile Ala Glu Lys Lys Asp  
 1175 1180 1185

gcc ttc tgc aaa gac tac ttc cac tgg tgc tac ctg gta ccc cag cac 4378  
 Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His Trp Cys Tyr Leu Val Pro Gln His  
 1190 1195 1200

ggg atg tgc agc cac aag ttc tac ggc aag cag tgc tgc aag act tgc 4426  
 Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys Lys Thr Cys  
 1205 1210 1215

tct aag tcc aac ttg tga gttgggaccg ctctccgtag cagagaaagt 4474  
 Ser Lys Ser Asn Leu  
 1220 1225

gcctgcgtgg cacagaaatt tcccacaaat gagctgtgca atctacgtcg gaatacatcc 4534

aaggaagagc aaagccaaaa gaagaaaacc gtgttaggct ctttgaccag gagtgtatgt 4594  
atgtgtttca ctgtgagcct gggcgcagac ctgtgtcccc atgcacacag tgtctcctgt 4654  
caggctgaaa tgtggcaccc tggcagacag agctgtggct cgtgaggcag aaggcaggca 4714  
ccacaacggg agaggcagca ctcacccctg cctgttcag ctaaatacaag tcaaaaagac 4774  
aggcgaggct gaacttgcta aatgtctggt gccttagaaa aagaaggaaa ggccatgaaa 4834  
taaggaaaac atacaaaata tgtacccctt agttcaccag cctccctcc cactaggagg 4894  
gccctcgcag ccatcaggag tgaccaactt cctgggtgga ggtcagggga gctccaggag 4954  
gctgccagg ctctctctcc tcctcccag cgcccgagca tctcttacca ggaacctgga 5014  
gccaccgccg gagccagcgt catctctagg gtcactggcc aggggactgc attctggttt 5074  
gggactttgc ctatggaaat gggaaaaatg aaattcctgc taaggctgtt ctatctcttt 5134  
cagattcatg cattgaagga gagatTTTT atactttatg ttttatcttt ctcatgtatt 5194  
tgcaagtgag tgcctttta aaaacacact tcttcagct tttctttgta aatgacagat 5254  
cgaagtatag gttacatcaa aacctacca tcctgagaag agttatggtt ctattatagc 5314  
agacgtcagc cacacagcct atgtgacaat aaccttagag tcctgtgttt tgtttttgtg 5374  
tgttgtgaga ttttaatttt ttttttttcg gtgagtctgg ccatttctat aatgccaggt 5434  
gggaagccag gctgcgggtg ttaggtggg aatctgccg gcgtctctgg caccctccct 5494  
gccatctca gtgcggctgc tgttctcctg tccggtgctg tggctccatt ccaaaggggc 5554  
acctggatat ttatatttgc tgaagtttta taataaagtt tatatggtac agtgtg 5610

24/45

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1224

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

```

Met Lys Pro Arg Ala Arg Gly Trp Arg Gly Leu Ala Ala Leu Trp Met
  1             5             10             15
Leu Leu Ala Gln Val Ala Glu Gln Ala Pro Ala Cys Ala Met Gly Pro
      20             25             30
Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Pro Pro Pro Pro
      35             40             45
Ala Glu Arg Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser
      50             55             60
Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met
      65             70             75             80
His His Gln Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser
      85             90             95
Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Pro Arg His Asp Phe His Met Asp Leu
      100            105            110
Arg Thr Ser Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu
      115            120            125
Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe
      130            135            140
Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala
      145            150            155            160
Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala
      165            170            175
Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly
      180            185            190
Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser
      195            200            205
Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg
      210            215            220
Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu
      225            230            235            240

```

25/45

Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met  
 245 250 255  
 Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys  
 260 265 270  
 Ser Cys Leu Arg His Lys Arg Ser Leu Leu Arg Ser His Arg Asn Glu  
 275 280 285  
 Glu Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Val Asp Lys Lys Met Met Gln  
 290 295 300  
 Asn His Gly His Glu Asn Ile Thr Thr Tyr Val Leu Thr Ile Leu Asn  
 305 310 315 320  
 Met Val Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Gly Asn Ile Asn  
 325 330 335  
 Ile Ala Ile Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu Asp Glu Gln Pro Gly Leu  
 340 345 350  
 Val Ile Ser His His Ala Asp His Thr Leu Ser Ser Phe Cys Gln Trp  
 355 360 365  
 Gln Ser Gly Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr Arg His Asp His Ala Ile  
 370 375 380  
 Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu Pro Cys Asp  
 385 390 395 400  
 Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys Tyr Arg Ser  
 405 410 415  
 Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr Ile Ala  
 420 425 430  
 His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu Gly Asn  
 435 440 445  
 Met Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Ala Gly  
 450 455 460  
 Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His  
 465 470 475 480  
 Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys  
 485 490 495  
 Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr  
 500 505 510  
 Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu  
 515 520 525  
 Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His

26/45

530	535	540
Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly		
545	550	555
Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys		560
565	570	575
Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp		
580	585	590
Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Ser His		
595	600	605
Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro Ser His Gly Gly Lys Phe		
610	615	620
Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu Cys Asn Ser Gln Lys Cys		
625	630	635
Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala Gln Cys Ala Glu His Asn		
645	650	655
Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Trp Lys Pro Tyr Thr Gln		
660	665	670
Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Cys Ile Ala Glu Gly Phe		
675	680	685
Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys		
690	695	700
Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Glu Arg Val		
705	710	715
Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala Val Glu Asp Val Cys Gly		
725	730	735
Val Cys Asn Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr Ile His Arg Gly Leu Tyr		
740	745	750
Thr Lys His His His Thr Asn Gln Tyr Tyr His Met Val Thr Ile Pro		
755	760	765
Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu Met Asn Val Ser Thr Ser		
770	775	780
Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg Tyr Tyr Leu Asn Gly His		
785	790	795
Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Ser Gly Thr Thr Phe		
805	810	815
Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu Asn Leu Ile Ala Thr Gly		
820	825	830

27/45

Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn  
 835 840 845  
 Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys  
 850 855 860  
 Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu  
 865 870 875 880  
 Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys  
 885 890 895  
 Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys  
 900 905 910  
 Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro  
 915 920 925  
 Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly  
 930 935 940  
 Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr  
 945 950 955 960  
 Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser  
 965 970 975  
 Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala  
 980 985 990  
 Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys  
 995 1000 1005  
 Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser Ala Arg Ala Gln Leu  
 1010 1015 1020  
 Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys Pro Arg Met His Glu  
 1025 1030 1035 1040  
 Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys Lys Leu Gln Trp Leu  
 1045 1050 1055  
 Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Glu Arg Gly Thr Gln  
 1060 1065 1070  
 Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Arg  
 1075 1080 1085  
 Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro Lys Pro Ser Leu Glu  
 1090 1095 1100  
 Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro Arg His Pro Pro Phe  
 1105 1110 1115 1120  
 Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe Ala Ser Pro Trp Ser

28/45

1125                      1130                      1135  
 Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val Gln  
 1140                      1145                      1150  
 Cys Leu Ala Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys Leu Leu His Gln Lys  
 1155                      1160                      1165  
 Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe Cys Pro Ile Ala Glu  
 1170                      1175                      1180  
 Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His Trp Cys Tyr Leu Val  
 1185                      1190                      1195                      1200  
 Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys  
 1205                      1210                      1215  
 Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu  
 1220

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 422

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (3)..(422)

&lt;400&gt; 5

gc acc gcc caa gcg ata tgt ctt gct gat cag cca aag cct gtg aaa 47

Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys Pro Val Lys

1

5

10

15

gag tat aag tac ccc gag aag ctg ccg gga cag tta tac gat gca aat 95

Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Gln Leu Tyr Asp Ala Asn

20

25

30

acc caa tgc aag tgg cag ttt gga gag aaa gcc aag ctc tgt atg ctg 143

Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu Cys Met Leu

35

40

45

29/45

gac ttc aga aag gac atc tgt aag gcc ttg tgg tgc cat cgg att gga 191  
 Asp Phe Arg Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His Arg Ile Gly  
           50                  55                  60

agg aaa tgt gag acc aag ttc atg cca gca gca gag ggt act ctg tgt 239  
 Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly Thr Leu Cys  
           65                  70                  75

ggg cag gac atg tgg tgt cgt gga gga cag tgt gtc aag tac ggt gat 287  
 Gly Gln Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys Tyr Gly Asp  
           80                  85                  90                  95

gaa ggc cca aag ccc acc cat ggc cat tgg tca gat tgg tcc ccc tgg 335  
 Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Trp  
                   100                  105                  110

tcc ccc tgc tcc agg acc tgt ggg gga gga atc tct cac aga gac cgt 383  
 Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Ile Ser His Arg Asp Arg  
                   115                  120                  125

ctc tgt acc aat ccc aga cca tct cat gga ggg aag ttt 422  
 Leu Cys Thr Asn Pro Arg Pro Ser His Gly Gly Lys Phe  
                   130                  135                  140

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys Pro Val Lys Glu  
           1                  5                  10                  15

Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Gln Leu Tyr Asp Ala Asn Thr  
           20                  25                  30

30/45

Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu Cys Met Leu Asp  
 35 40 45

Phe Arg Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His Arg Ile Gly Arg  
 50 55 60

Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly Thr Leu Cys Gly  
 65 70 75 80

Gln Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys Tyr Gly Asp Glu  
 85 90 95

Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Trp Ser  
 100 105 110

Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Ile Ser His Arg Asp Arg Leu  
 115 120 125

Cys Thr Asn Pro Arg Pro Ser His Gly Gly Lys Phe  
 130 135 140

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 545

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus. musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (21)..(545)

&lt;400&gt; 7

atgatggaga agggaacatg tgc aag aaa tct gag ggc aac att atg tcc cca 53

Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro

1

5

10

31/45

aca ctg gca gga cgc aat ggt gtc ttc tcc tgg tct tcc tgc agc cgt 101  
 Thr Leu Ala Gly Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Ser Cys Ser Arg  
                   15                  20                  25

cag tac ctg cac aag ttc tta agc acc gcc caa gcg ata tgt ctt gct 149  
 Gln Tyr Leu His Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala  
                   30                  35                  40

gat cag cca aag cct gtg aaa gag tat aag tac ccc gag aag ctg ccg 197  
 Asp Gln Pro Lys Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro  
                   45                  50                  55

gga cag tta tac gat gca aat acc caa tgc aag tgg cag ttt gga gag 245  
 Gly Gln Leu Tyr Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu  
                   60                  65                  70                  75

aaa gcc aag ctc tgt atg ctg gac ttc aga aag gac atc tgt aag gcc 293  
 Lys Ala Lys Leu Cys Met Leu Asp Phe Arg Lys Asp Ile Cys Lys Ala  
                                   80                  85                  90

ttg tgg tgc cat cgg att gga agg aaa tgt gag acc aag ttc atg cca 341  
 Leu Trp Cys His Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro  
                   95                  100                  105

gca gca gag ggt act ctg tgt ggg cag gac atg tgg tgt cgt gga gga 389  
 Ala Ala Glu Gly Thr Leu Cys Gly Gln Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly  
                   110                  115                  120

cag tgt gtc aag tac ggt gat gaa ggc cca aag ccc acc cat ggc cat 437  
 Gln Cys Val Lys Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His  
                   125                  130                  135

tgg tca gat tgg tcc ccc tgg tcc ccc tgc tcc agg acc tgt ggg gga 485  
 Trp Ser Asp Trp Ser Pro Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly  
                   140                  145                  150                  155

32/45

gga atc tct cac aga gac cgt ctc tgt acc aat ccc aga cca tct cat 533  
 Gly Ile Ser His Arg Asp Arg Leu Cys Thr Asn Pro Arg Pro Ser His  
                   160                  165                  170

gga ggg aag ttt 545  
 Gly Gly Lys Phe  
                   175

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 175

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 8

Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Ala Gly Arg  
       1                  5                  10                  15

Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Ser Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His Lys  
                   20                  25                  30

Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys Pro  
                   35                  40                  45

Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Gln Leu Tyr Asp  
                   50                  55                  60

Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu Cys  
       65                  70                  75                  80

Met Leu Asp Phe Arg Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His Arg  
                   85                  90                  95

Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly Thr  
                   100                  105                  110

Leu Cys Gly Gln Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys Tyr

33/45

115	120	125
Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp Ser		
130	135	140
Pro Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Ile Ser His Arg		
145	150	155 160
Asp Arg Leu Cys Thr Asn Pro Arg Pro Ser His Gly Gly Lys Phe		
165	170	175

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 8435

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:base sequence  
of the plasmid pFastBac1-HT-PJ01256

&lt;400&gt; 9

gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc 60  
gctacacttg ccagcgccct agcgcgcgct cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc 120  
acgttcgcgc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt 180  
agtgccttac ggcacctcga ccccaaaaaa ctgattagg gtgatgggtc acgtagtggg 240  
ccatcgccct gatagacggt ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt 300  
ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc ttttgattta 360  
taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt 420  
aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt tcggggaaat 480  
gtgcgcggaa cccctatttg tttatcttct taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 540  
agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa 600  
catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac 660  
ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac 720  
atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt 780  
ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccc tattgacgcc 840

gggcaagagc aactcggctc cgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca 900  
 ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc 960  
 ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag 1020  
 gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa 1080  
 ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc ttagcaatg 1140  
 gcaacaacgt tgcgaaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 1200  
 ttaatagact ggatggaggc ggataaagt gaggaccac ttctgcgtc ggcccttccg 1260  
 gctggctggg ttattgtctg taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 1320  
 gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 1380  
 caggcaacta tggatgaacg aatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag 1440  
 cattggtaac tgcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 1500  
 ttttaattta aaagatctta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 1560  
 taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct 1620  
 tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc tgcctgcaa caaaaaacc accgtacca 1680  
 gcggtggttt gtttccgga tcaagagcta ccaactctt ttccgaagg aactggcttc 1740  
 agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 1800  
 aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct 1860  
 gccagtggcg ataagctgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 1920  
 gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga gcgaacgacc 1980  
 tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgt tcccgaagg 2040  
 agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg caccagggag 2100  
 cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 2160  
 gagcgtcgat ttttgtgat ctctgcagg gggcggagcc tatggaaaa cgccagcaac 2220  
 gcggcctttt tacggttctt gcccttttgc tggcctttt ctcatgtt ctttctgcg 2280  
 ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgccttg agtgagctga taccgctgc 2340  
 cgcagccgaa cgaccgagc cagcgagtca gtgagcagg aagcggaaga gcgcctgatg 2400  
 cggtatcttc tccttacgca tctgtcggg atttcacacc gcagaccagc cgcgtaacct 2460  
 ggcaaaatcg gttacggtt agtaataaat ggatgccctg cgtaacggg tgtggcgga 2520  
 caataaagtc ttaaactgaa caaaatagat ctaaactatg acaataaagt cttaaactag 2580  
 acagaatagt tgtaaactga aatcagtcca gttatgctg gaaaaagcat actggacttt 2640  
 tgttatggct aaagcaaac cttcattttc tgaagtcaa attgccgct gtattaaaga 2700  
 gggcggtggc caaggcatg gtaaagacta tattcgcgcc gttgtgacaa ttaccgaac 2760  
 aactccgagg ccgggaagcc gatctcggt tgaacgaatt gttaggtggc ggtacttggg 2820  
 tcgatataca agtgcacac ttcttcccgt atgccaact ttgtatagag agccactgag 2880  
 ggatcgtcac cgtaatctgc ttgcacgtag atcacataag caccaagcgc gttggcctca 2940  
 tgcttgagga gattgatgag cgcggtggca atgccctgcc tccggtgct gccggagact 3000  
 gcgagatcat agatatagat ctactacgc ggctgctcaa acctgggcag aacgtaagcc 3060

gcgagagcgc caacaaccgc ttcttggtcg aaggcagcaa gcgcgatgaa tgtcttacta 3120  
cggagcaagt tcccaggta atcggagtcc ggctgatgtt gggagtaggt ggctacgtct 3180  
ccgaactcac gaccgaaaag atcaagagca gcccgcatgg atttgacttg gtcagggccg 3240  
agcctacatg tgcgaatgat gcccatactt gagccaccta actttgtttt agggcgactg 3300  
ccctgctgcg taacatcggt gctgctgctt aacatcggtg ctgctccata acatcaaaca 3360  
tcgaccacag gcgtaacgcg cttgctgctt ggatgcccga ggcatagact gtacaaaaaa 3420  
acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgccgta ccaccgtgc gttcgggtcaa 3480  
ggttctggac cagttgcgtg agcgcatagc ctacttgcac tacagtttac gaaccgaaca 3540  
ggcttatgtc aactgggttc gtgccttcat ccgtttccac ggtgtgcgtc acccggaac 3600  
cttgggcagc agcgaagtcg aggcatttct gtcttggtg gcgaacgagc gcaaggtttc 3660  
ggtctccacg catcgtcagg cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg 3720  
cacggatctg ccctggcttc aggagatcgg aagacctcgg ccgtcggcg gcttgccggt 3780  
ggtgctgacc ccggatgaag tggttcgcat cctcggtttt ctggaaggcg agcatcgttt 3840  
gttcgcccag gactctagct atagtctag tggttggcta cgtatactcc ggaatattaa 3900  
tagatcatgg agataattaa aatgataacc atctcgcaa taaataagta ttttactgtt 3960  
ttcgtaacag ttttgaata aaaaacctt taaatattcc ggattattca taccgtccca 4020  
ccatcggcgc cggatcccg agcgtcctg gatgaagccc cgcgcgcgcg gatggcgggg 4080  
cttggcggcg ctgtggatgc tgctggcgca ggtggccgag caggcacctg cgtcgccat 4140  
gggaccgcga gcggcagcgc ctgggagccc gagcgtccg cgtcctcctc caccgcgga 4200  
gcggccgggc tggatggaag agggcgaata tgacctggtc tctgcctacg aggttgacca 4260  
cagggcgcat tacgtgtccc atgaaatcat gcaccatcag cggcggagaa gagcagtggc 4320  
cgtgtccgag gttgagtctc ttacacctcg gctgaaaggc ccaggcacg acttcacat 4380  
ggatctgagg acttccagca gcctagtggc tcctggcttt attgtgcaga cgttgggaaa 4440  
gacaggcact aagtctgtgc agactttacc gccagaggac ttctgtttct atcaaggctc 4500  
tttgcgatca cacagaaact cctcagtggc ctttcaacc tgccaaggct tgcaggcat 4560  
gatacgaaca gaagaggcag attacttctt aaggccactt cttcacacc tctcatgga 4620  
actcggcaga gctgcccag gcagctcgc atcccacgta ctgtacaaga gatccacaga 4680  
gccccatgct cctggggcca gtgaggtcct ggtgacctca aggacatggg agctggcaca 4740  
tcaaccctg cacagcagcg acctcgcct gggactgcc caaaagcagc atttctgtgg 4800  
aagacgcaag aaatacatgc ccagcctcc caaggaagac ctcttcatct tgccagatga 4860  
gtataagtct tgcttacggc ataagcgctc tcttctgagg tcccatagaa atgaagaact 4920  
gaacgtggag accttggtg tggtcgacaa aaagatgatg caaaaccatg gccatgaaaa 4980  
tatcaccacc tacgtgtcga cgatactcaa catggtatct gctttattca aagatggaac 5040  
aataggagga aacatcaaca ttgcaattgt aggtctgatt cttctagaag atgaacagcc 5100  
aggactggtg ataagtcacc acgcagacca caccttaagt agcttctgcc agtggcagtc 5160  
tggattgatg gggaaagatg ggactcgtca tgaccagcc atcttactga ctggtctgga 5220  
tatatgttcc tggaagaatg agccctgtga cactttggga tttgcacca taagtggaat 5280

gtgtagtaaa tatcgagct gcacgattaa tgaagataca ggtcttggac tggccttcac 5340  
cattgcccatt gagtctggac acaactttgg catgattcat gatggagaag ggaacatgtg 5400  
taaaaagtcc gagggcaaca tcatgtcccc tacattggca ggacgcaatg gagtcttctc 5460  
ctggtcacc tgcagccgcc agtatctaca caaatttcta agcaccgctc aagctatctg 5520  
ccttgctgat cagccaaagc ctgtgaagga atacaagtat cctgagaaat tgccaggaga 5580  
attatatgat gcaaacacac agtgcaagtg gcagttcgga gagaagcca agctctgcat 5640  
gtggacttt aaaaaggaca tctgtaaagc cctgtggtgc catcgtattg gaaggaaatg 5700  
tgagactaaa tttatgccag cagcagaagg cacaatttgt gggcatgaca tgtgtgccc 5760  
gggaggacag tgtgtgaaat atggtgatga agggcccaag cccacccatg gccactggtc 5820  
ggactggtct tcttggtccc catgctccag gacctgcgga gggggagtat ctcataggag 5880  
tcgctctgc accaacccca agccatcgca tggagggaag ttctgtgagg gctccactcg 5940  
cactctgaag ctctgcaaca gtcagaaatg tccccggac agtgttgact tccgtgctgc 6000  
tcagtgtgcc gagcacaaca gcagacgatt cagaggcg cactacaagt ggaagcctta 6060  
cactcaagta gaagatcagg acttatgcaa actctactgt atcgcagaag gatttgattt 6120  
cttcttttct ttgtcaaata aagtaaaga tgggactcca tgctcgagg atagccgtaa 6180  
tgtttgtata gatgggatat gtgagagagt tggatgtgac aatgtccttg gatctgatgc 6240  
tgttgaagac gtctgtgggg tgtgtaacgg gaataactca gcctgcacga ttcacagggg 6300  
tctctacacc aagcaccacc acaccaacca gtattatcac atggtcacca ttcttcttg 6360  
agcccgagat atccgcatct atgaaatgaa cgtctctacc tcctacattt ctgtgcgcaa 6420  
tgccctcaga aggtactacc tgaatgggca ctggaccgtg gactggccc gccggtacaa 6480  
attttcgggc actactttcg actacagacg gtcctataat gagcccgaga acttaatcgc 6540  
tactggacca accaacgaga cactgattgt ggagctgctg tttcaggga ggaaccggg 6600  
tgttgcttg gaataactca tgcctcgctt ggggaccgag aagcagcccc ctgccagcc 6660  
cagctacact tgggccatcg tgcgtctga gtgctccgtg tcctgcggag ggggacagat 6720  
gaccgtgaga gagggctgct acagagacct gaagttcaa gtaaatatgt cttctgcaa 6780  
tcccaagaca cgacctgtca cgggctggt gccttgcaa gtatctgcct gtcctcccag 6840  
ctggtccgtg gggaactgga gtgcctgcag tcggacgtgt ggcgggggtg cccagagccg 6900  
ccccgtgcag tgcacacggc gggtgcacta tgactcggag ccagtcccgg ccagcctgtg 6960  
ccctcagcct gtcctctca gcagcagge ctgcaactct cagagctgcc cacctgcatg 7020  
gagcggcgg ccctgggcag agtgcacaca cacctgtggg aaggggtgga ggaagcggc 7080  
agtggcctgt aagagacca acccctcggc cagagcgag ctgctgccc acgtgtctg 7140  
cacctccgag cccaagccca ggatgcata agcctgtctg cttcagcgt gccacaagcc 7200  
caagaagctg cagtggctgg tgtccgctg gtcccagtgc tctgtgacat gtgaaagagg 7260  
aacacagaaa agattcttaa aatgtgctga aaagtatgt tctggaaagt atcgagagct 7320  
ggcctcaaag aagtgtcac atttccgaa gccagcctg gagctggaac gtgcctgcgc 7380  
cccgcttcca tgccccaggc acccccatt tgctgctgcg ggaccctcga ggggcagctg 7440  
gtttgcctca ccctggctc agtgcacggc cagctgtggg ggaggcgtc agacgaggtc 7500

37/45

```

cgtgcagtgc ctggctgggg gccggccggc ctcaggctgc ctctgcacc agaagccttc 7560
ggcctccctg gcctgcaaca ctacttctg ccccatgca gagaagaaag atgccttctg 7620
caaagactac ttccactggt gctacctggt accccagcac gggatgtgca gccacaagtt 7680
ctacggcaag cagtgtgca agacttgctc taagtccaac ttgaagcttg aacaaaaact 7740
catctcagaa gaggatctga atagcgccgt cgaccatcat catcatcatc attgagagct 7800
tgtcgagaag tactagagga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc 7860
tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt 7920
tgttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt 7980
cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtgtt ttgtccaaac tcatcaatgt 8040
atcttatcat gtctggatct gatcactgct tgagcctagg agatccgaac cagataagtg 8100
aaatctagtt ccaaactatt ttgtcatttt taattttcgt attagcttac gacgctacac 8160
ccagttccca tctattttgt cactcttccc taaataatcc ttaaaaaact catttccacc 8220
cctcccagtt cccaactatt ttgtccgccc acagcggggc atttttcttc ctgttatgtt 8280
tttaatcaaa catcctgcca actccatgtg acaaaccgtc atcttcggct actttttctc 8340
tgtcacagaa tgaaaatttt tctgtcatct cttcgttatt aatgtttgta attgactgaa 8400
tatcaacgct tatttgcagc ctgaatggcg aatgg                                     8435

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 8505

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:base sequence  
of the plasmid pFastBac1-MS/HT-PJ01256-2

&lt;400&gt; 10

```

gacgcgccct gtagcgcgcg attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc 60
gctacacttg ccagcgccct agcgccgct ctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc 120
acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt 180
agtgttttac ggcacctcga cccccaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg 240
ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt 300
ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc ttttgattta 360
taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt 420
aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt tcggggaaat 480
gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 540

```

agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa 600  
 catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac 660  
 ccagaaacgc tgggtaaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac 720  
 atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttgccccga agaacgtttt 780  
 ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcggg tattatcccg tattgacgcc 840  
 gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca 900  
 ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc 960  
 ataacatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag 1020  
 gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa 1080  
 ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg 1140  
 gcaacaacgt tgcgcaaac attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 1200  
 ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttccg 1260  
 gctggctggt ttattgtgta taaatctgga gccggtagc gtgggtctcg cggtatcatt 1320  
 gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 1380  
 caggcaacta tggatgaacg aatagacag atcgtcgaga taggtgcctc actgattaag 1440  
 cattggtaac tgcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 1500  
 ttttaattta aaagatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 1560  
 taacgtgagt ttctgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct 1620  
 tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaa caaaaaaac accgtacca 1680  
 gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc 1740  
 agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 1800  
 aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct 1860  
 gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 1920  
 gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga gcgaacgacc 1980  
 tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg 2040  
 agaaaggcgg acaggatatcc ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg cagcaggag 2100  
 cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 2160  
 gagcgtcgat ttttgtgatg ctgcgcaggg gggcgagacc tatggaaaaa cgccagcaac 2220  
 gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctacatggt ctttctgctg 2280  
 ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 2340  
 cgcagccgaa cgaccgagcg cagcagtgca gtgagcagg aagcggaga gcgcctgatg 2400  
 cggtattttc tccttacgca tctgtcgggt atttcacacc gcagaccagc cgcgtaacct 2460  
 ggcaaaatcg gttacggttg agtaataaat ggatgcctg cgtaagcggg tgtggcgga 2520  
 caataaagtc ttaaactgaa caaaatagat ctaaactatg acaataaagt cttaaactag 2580  
 acagaatagt tgtaaactga aatcagcca gttatgctgt gaaaagcat actggacttt 2640  
 tgttatggct aaagcaaac cttcattttc tgaagtcaa attgccgctc gtattaaaga 2700  
 ggggcgtggc caaggcatg gtaaagacta tattcgcggc gttgtgacaa tttaccgaac 2760

aactccgagg ccggaagcc gatctcggct tgaacgaatt gttaggtagc ggtacttggg 2820  
tcgatatcaa agtgcacac ttcttccgt atgccaact ttgtatagag agccactgcg 2880  
ggatcgtcac cgtaactctg ttgcacgtag atcacataag caccaagcgc gttggcctca 2940  
tgcttgagga gattgatgag cgcggtggca atgccctgcc tccggtgctc gccggagact 3000  
gcgagatcat agatatagat ctactacgc ggctgctcaa acctgggcag aacgtaagcc 3060  
gcgagagcgc caacaaccgc ttcttggtcg aaggcagcaa gcgcatgaa tgtcttacta 3120  
cggagcaagt tcccaggga atcggagtcc ggctgatgtt gggagtaggt ggtactgtct 3180  
ccgaactcac gaccgaaaag atcaagagca gcccgcatgg atttgacttg gtcagggccg 3240  
agcctacatg tgcgaatgat gccatactt gagccaccta actttgtttt agggcgactg 3300  
ccctgtcgcg taacatcggt gctgctgctg aacatcggtg ctgctccata acatcaaaca 3360  
tcgaccacag gcgtaacgcg cttgctgctt ggatgccga ggcatagact gtacaaaaaa 3420  
acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgccgta ccaccgctgc gttcgggtcaa 3480  
ggttctggac cagttgcgtg agcgcatagc ctacttgcat tacagtttac gaaccgaaca 3540  
ggcttatgtc aactgggttc gtgccttcat ccgttccac ggtgtgcgtc acccggaac 3600  
cttgggcagc agcgaagtcg aggcatttct gtcttggtg gcgaacgagc gcaaggtttc 3660  
ggtctccacg catcgtcagg cattggcggc cttgtgttc ttctacggca aggtgctgtg 3720  
cacggatctg ccctggcttc aggagatcgg aagacctcg ccgtcgcggc gcttccgggt 3780  
ggtgtgacc ccggtgaag tggttcgcat cctcggtttt ctggaaggcg agcatcggtt 3840  
gttcgcccag gactctagct atagttctag tggttggcta cgtatactcc ggaatattaa 3900  
tagatcatgg agataattaa aatgataacc atctcgcaa taaataagta ttttactgtt 3960  
ttcgtaacag ttttgaata aaaaaaccta taaatattcc ggattattca taccgtccca 4020  
ccatcggcgc cggatcgatg aaattcttag tcaacgttgc cttgttttt atggtcgtgt 4080  
acatttctta catctacgcg gggatcccgc agcgtcctg gatgaagccc cgcgcgcgcg 4140  
gatggcgggc cttggcggcg ctgtggatgc tgctggcgca ggtggccgag caggcacctg 4200  
cgtgcgccat gggaccgcga gcggcagcgc ctgggagccc gagcgtcccg cgtcctctc 4260  
caccgcgga gcggccgggc tggatggaaa agggcgaata tgacctggtc tctgcctacg 4320  
aggttgacca caggggcgat tacgtgtccc atgaaatcat gcaccatcag cggcggagaa 4380  
gagcagtggc cgtgtccgag gttgagtctc ttacacctg gctgaaaggc ccagggcag 4440  
acttcacat ggatctgagg acttcagca gcctagtggc tcctggcttt attgtgcaga 4500  
cgttgggaaa gacaggcact aagtctgtgc agactttacc gccagaggac ttctgtttct 4560  
atcaaggctc tttcgatca cacagaaact cctcagtggc ctttcaacc tgccaaggct 4620  
tgtcaggcat gatacgaaca gaagaggcag attacttctt aaggccactt cttcacacc 4680  
tctcatggaa actcggcaga gctgcccaag gcagctgcc atcccacgta ctgtacaaga 4740  
gatccacaga gcccctgct cctggggcca gtgaggtcct ggtgacctca aggacatggg 4800  
agctggcaca tcaaccctg cacagcagcg acctgcctt gggactgcca caaaagcagc 4860  
atttctgtgg aagacgaag aaatacatgc ccagcctcc caaggaagac ctcttcatct 4920  
tgccagatga gtataagtct tgcttacggc ataagcgtc tcttctgagg tcccatagaa 4980

atgaagaact gaacgtggag accttgggtg tggtcgacaa aaagatgatg caaaaccatg 5040  
gccatgaaaa taccaccacc tacgtgctca cgatactcaa catggtatct gctttattca 5100  
aagatggaac aataggagga aacatcaaca ttgcaattgt aggtctgatt cttctagaag 5160  
atgaacagcc aggactgggtg ataagtcacc acgcagacca caccttaagt agcttctgcc 5220  
agtggcagtc tggattgatg gggaagatg ggactcgtca tgaccacgcc atcttactga 5280  
ctggtctgga tatatgttcc tggaagaatg agccctgtga cactttggga tttgcaccca 5340  
taagtggatg gtgtagtaaa tatcgagct gcacgattaa tgaagataca ggtcttggac 5400  
tggccttcac cattgcccat gagtctggac acaactttgg catgattcat gatggagaag 5460  
ggacatgtg taaaaagtcc gagggcaaca tcatgtcccc tacattggca ggacgcaatg 5520  
gagtcttctc ctggtcaccc tgcagccgcc agtatctaca caaatttcta agcaccgctc 5580  
aagctatctg ccttgtgatg cagccaaagc ctgtgaagga atacaagtat cctgagaaat 5640  
tgccaggaga attatatgat gcaaacacac agtgcaagtg gcagttcgga gagaaagcca 5700  
agctctgcat gctggacttt aaaaaggaca tctgtaaagc cctgtgggtc catcgtattg 5760  
gaaggaaatg tgagactaaa tttatgccag cagcagaagg cacaatttgt gggcatgaca 5820  
tgtggtgccg gggaggacag tgtgtgaaat atggtgatga aggccccaag cccacccatg 5880  
gccactggtc ggactgggtc tcttgggtccc catgctccag gacctgcgga gggggagtat 5940  
ctcataggag tcgcctctgc accaacccca agccatcgca tggagggag ttctgtgagg 6000  
gtccactcg cactctgaag ctctgcaaca gtcagaaatg tccccgggac agtgttgaat 6060  
tccgtgtctg tcagtgtgcc gagcacaaca gcagacgatt cagagggcgg cactacaagt 6120  
ggaagcctta cactcaagta gaagatcagg acttatgcaa actctactgt atcgagaag 6180  
gatttgattt cttcttttct ttgtcaaata aagtcaaaga tgggactcca tgctcggagg 6240  
atagccgtaa tgtttgtata gatgggatat gtgagagagt tggatgtgac aatgtcctg 6300  
gatctgatgc tgttgaagac gtctgtgggg tgtgtaacgg gaataactca gcctgcacga 6360  
ttcacagggg tctctacacc aagcaccacc acaccaacca gtattatcac atggtcacca 6420  
ttccttctgg agcccgagat atccgcatct atgaaatgaa cgtctctacc tcctacattt 6480  
ctgtgcgcaa tgccctcaga aggtactacc tgaatgggca ctggaccgtg gactggcccc 6540  
gccggtacaa attttcgggc actactttcg actacagacg gtcctataat gagcccgaga 6600  
acttaatcgc tactggacca accaacgaga cactgattgt ggagctgctg tttcagggaa 6660  
ggaacccggg tgttgcctgg gaatactcca tgcctcgctt ggggaccgag aagcagcccc 6720  
ctgcccagcc cagctacact tgggccatcg tgcgtctga gtgctccgtg tcctgcggag 6780  
ggggacagat gaccgtgaga gagggctgct acagagacct gaagtttcaa gtaaataatgt 6840  
cttctgcaa tcccaagaca cgactgtca cggggctggt gccttgcaaa gtatctgcct 6900  
gtcctcccag ctggtccgtg gggaaactgga gtgcctgcag tcggacgtgt ggccgggggtg 6960  
cccagagccg ccccgtcag tgcacacggc ggggtgacta tgactcggag ccagtcccgg 7020  
ccagcctgtg ccctcagcct gctccctcca gcaggcaggc ctgcaactct cagagctgcc 7080  
cacctgcatg gagcgccggg ccctgggcag agtgctcaca cacctgtggg aagggggtga 7140  
ggaagcgggc agtggcctgt aagagacca acccctcggc cagagcgag ctgctgcccc 7200

41/45

```

acgtgtctg cacctccgag cccaagccca ggatgcatga agcctgtctg cttcagcgct 7260
gccacaagcc caagaagctg cagtggctgg tgtccgcctg gtcccagtc tctgtgacat 7320
gtgaaagagg aacacagaaa agattcttaa aatgtgctga aaagtatgtt tctggaaagt 7380
atcgagagct ggcctcaaag aagtgtcac atttgcgaa gccagcctg gagctggaac 7440
gtgcctgcgc cccgcttcca tgccccaggc acccccatt tgctgctgcg ggaccctcga 7500
ggggcagctg gtttgcctca ccctgtctc agtgacggc cagctgtggg ggaggcgctc 7560
agacgaggtc cgtgcagtc ctggctggg gccggccggc ctcaggctgc ctctgcacc 7620
agaagccttc ggcctccctg gcctgaaca ctacttctg cccattgca gagaagaaag 7680
atgccttctg caaagactac ttccactggt gctacctggt accccagcac gggatgtgca 7740
gccacaagtt ctacggcaag cagtgtgca agactgtc taagtccaac ttgaagcttg 7800
aacaaaaact catctcagaa gaggatctga atagcgccg cgaccatcat catcatcatc 7860
attgagagct tgcgagaag tactagagga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg 7920
tttacttgc ttaaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaatgaatg 7980
caattgtgtg tgtaacttg ttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca 8040
tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac 8100
tcatcaatgt atcttatcat gtctggatct gatcactgct tgagcctagg agatccgaac 8160
cagataagtg aaatctagtt ccaaactatt ttgtcatttt taattttcgt attagcttac 8220
gagctacac ccagttccca tctatttgt cactcttccc taaataatcc ttaaaaactc 8280
catttccacc cctcccagtt cccaactatt ttgtccgcc acagcggggc atttttctc 8340
ctgttatgtt ttaaatcaaa catcctgcca actccatgtg acaaaccgtc atcttcggct 8400
actttttctc tgtcacagaa tgaatattt tctgtcatct cttcgttatt aatgtttgta 8460
attgactgaa tatcaacgct tatttcagc ctgaatggcg aatgg 8505

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 7668

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:base sequence  
of the plasmid pFastBac1-MS/HT-PJ01256-1

&lt;400&gt; 11

```

gacgcgcct gtagcggcg attaagcgc ggggtgtg tggtacgc cagcgtgacc 60
gctacacttg ccagcgcct agcgcgcct ctttcgct tcttccctt ctttctgcc 120
acgttcgcc gtttccccg tcaagctcta aatcggggc tcccttagg gttccgatt 180

```

agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg 240  
ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttg agtccacgtt ctttaatagt 300  
ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctatc ttttgattta 360  
taagggaatt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta aaaaaattt 420  
aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt tcggggaaat 480  
gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 540  
agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa 600  
catttcctgt tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac 660  
ccagaaacgc tgggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac 720  
atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt 780  
ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcggg tattatcccg tattgacgcc 840  
gggcaagagc aactcggctc cgcatacac tattctcaga atgacttggg ttagtactca 900  
ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgc 960  
ataacatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag 1020  
gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa 1080  
ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc ttagcaatg 1140  
gcaacaacgt tgcgcaact attaaactgc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 1200  
ttaatagact ggatggaggc ggataaagt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg 1260  
gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 1320  
gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 1380  
caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag 1440  
cattggtaac tgcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 1500  
ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 1560  
taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct 1620  
tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca 1680  
gcgggtggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactctt ttccgaaggt aactggcttc 1740  
agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 1800  
aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct 1860  
gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 1920  
gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc 1980  
tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct tccgaaggg 2040  
agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg cagagggag 2100  
cttcagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 2160  
gagcgtcgat ttttgtgatg ctgcctcagg gggcggagcc tatggaaaaa cggcagcaac 2220  
gcggcctttt tacggttctt ggccttttgc tggccttttg ctcatatgtt ctttctgcg 2280  
ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgccttg agtgagctga taccgctcgc 2340  
cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcgaaga gcgcctgatg 2400

cggtattttc tccttacgca tctgtcggt atttcacacc gcagaccagc cgcgtaacct 2460  
ggcaaatcg gttacggtg agtaataaat ggatgccctg cgtaagcggg tgtggcgga 2520  
caataaagtc ttaaaactgaa caaaatagat ctaaactatg acaataaagt cttaaactag 2580  
acagaatagt tgtaaactga aatcagtcga gttatgctgt gaaaaagcat actggacttt 2640  
tgttatggct aaagcaaaact cttcattttc tgaagtgaat attgccctg gtattaaaga 2700  
ggggcggtggc caagggcatg gtaaagacta tattcgcggc gttgtgaca tttaccgaac 2760  
aactccgagg cggggaagcc gatctcggct tgaacgaatt gttaggtggc ggtacttggg 2820  
tcgatatcaa agtgcacac ttcttcccg atgcccaact ttgtatagag agccactgag 2880  
ggatcgtcac cgtaactcgc ttgcacgtag atcacataag caccaagcgc gttggcctca 2940  
tgcttgagga gattgatgag cgcggtggca atgccctgcc tccggtgctc gccggagact 3000  
gcgagatcat agatatagat ctactacgc ggctgctcaa acctgggcag aacgtaagcc 3060  
gcgagagcgc caacaaccgc ttcttggtcg aaggcagcaa gcgcatgaa tgtcttacta 3120  
cggagcaagt tcccaggga atcggagtc ggctgatgtt gggagtaggt ggctacgtct 3180  
ccgaactcac gaccgaaaag atcaagagca gcccgcatgg atttgacttg gtcagggccg 3240  
agcctacatg tgcgaatgat gcccatactt gagccaccta actttgtttt agggcgactg 3300  
ccctgctgag taacatcgtt gctgctgctt aacatcgtt ctgctccata acatcaaaaca 3360  
tcgaccacag gcgtaacgcg cttgctgctt ggatgccga ggcatagact gtacaaaaaa 3420  
acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgcggtta ccaccgctgc gttcgggtcaa 3480  
ggttctggac cagttgcgtg agcgcatagc ctacttgcat tacagtttac gaaccgaaca 3540  
ggcttatgct aactgggttc gtgccttcat ccgtttccac ggtgtgcgtc acccggaac 3600  
cttgggcagc agcgaagtcg aggcatttct gtcctggctg gcgaacgagc gcaaggtttc 3660  
ggtctccacg catcgtcagg cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg 3720  
cacggatctg ccctggcttc aggagatcgg aagacctcgg ccgtcgcggc gcttcccggt 3780  
ggtgctgacc ccgatgaag tggttcgc atctcggttt ctggaaggcg agcatcgttt 3840  
gttcgcccag gactctagct atagttctag tggttggcta cgtatactcc ggaatattaa 3900  
tagatcatgg agataattaa aatgataacc atctcgaaa taaataagta ttttactgtt 3960  
ttcgtaacag ttttgtaata aaaaaaccta taaatattcc ggattattca taccgtccca 4020  
ccatcgggag cggatcgatg aaattcttag tcaacgttgc ccttgttttt atggtcgtgt 4080  
acatttctta catctacgcg gggatcctac ggcataagcg ctctcttctg aggtcccata 4140  
gaaatgaaga actgaacgtg gagaccttgg tgggtgtcga caaaaagatg atgcaaaacc 4200  
atggccatga aatatcacc acctacgtgc tcacgatact caacatggta tctgctttat 4260  
tcaaatagtg aacaatagga ggaacatca acattgcaat ttaggtctg attcttctag 4320  
aagatgaaca gccaggactg gtgataagtc accacgcaga ccacacctta agtagcttct 4380  
gccagtggca gtctggattg atggggaag atgggactcg tcatgaccac gccatcttac 4440  
tgactggtct ggatatatgt tcctggaaga atgagccctg tgacactttg ggatttgac 4500  
ccataagtgg aatgtgtagt aaatatcgca gctgcacgat taatgaagat acaggtcttg 4560  
gactggcctt caccattgac catgagctg gacacaactt tggcatgatt catgatggag 4620

aagggaacat gtgtaaaaag tccgagggca acatcatgtc ccctacattg gcaggacgca 4680  
atggagtctt ctcttggtca ccctgcagcc gccagtatct acacaaattt ctaagcaccg 4740  
ctcaagctat ctgccttgct gatcagccaa agcctgtgaa ggaatacaag tatcctgaga 4800  
aattgccagg agaattatat gatgcaaaca cacagtgcaa gtggcagttc ggagagaaaag 4860  
ccaagctctg catgctggac tttaaaaagg acatctgtaa agccctgtgg tgccatcgta 4920  
ttggaaggaa atgtgagact aaatttatgc cagcagcaga aggcacaatt tgtgggcatg 4980  
acatgtgggt cgggggagga cagtgtgtga aatatgggtga tgaaggcccc aagcccccc 5040  
atggccactg gtcggactgg tcttcttggt ccccatgctc caggacctgc ggagggggag 5100  
tatctcatag gagtgcctc tgcaccaacc ccaagccatc gcatggaggg aagttctgtg 5160  
agggtccac tcgcaactctg aagctctgca acagtcagaa atgtccccg gacagtgttg 5220  
acttcctgtc tgctcagtgt gccgagcaca acagcagacg attcagaggg cggcactaca 5280  
agtggaaacc ttacaactcaa gtagaagatc aggacttatg caaactctac tgtatcgag 5340  
aaggatttga tttcttcttt tctttgtcaa ataaagtcaa agatgggact ccatgctcgg 5400  
aggatagccg taatgtttgt atagatggga tatgtgagag agttggatgt gacaatgtcc 5460  
ttgatctga tgctgttga gacgtctgtg ggggtgtgaa cggaataac tcagcctgca 5520  
cgattcacag ggtctctac accaagcacc accacaccaa ccagtattat cacatggtca 5580  
ccattccttc tggagcccgg agtatccgca tctatgaaat gaacgtctct acctctaca 5640  
tttctgtcgg caatgccctc agaaggtact acctgaatgg gcactggacc gtggactggc 5700  
cggccggta caaattttcg ggcactactt tcgactacag acggtcctat aatgagcccg 5760  
agaacttaat cgctactgga ccaaccaacg agacactgat tgtggagctg ctgtttcagg 5820  
gaaggaaccc ggggtgtgcc tgggaatact ccatgcctcg cttggggacc gagaagcagc 5880  
cccctgccc gcccagctac acttgggcca tcgtgcgctc tgagtgtcc gtgtcctgcg 5940  
gagggggaca gatgacctg agagagggt gctacagaga cctgaagttt caagtaaata 6000  
tgtccttctg caatcccaag acacgacctg tcacggggct ggtgccttgc aaagtatctg 6060  
cctgtcctcc cagctggtcc gtggggaact ggagtgcctg cagtcggacg tgtggcgggg 6120  
gtgccagag ccgccccgtg cagtgcacac ggccgggtgca ctatgactcg gagccagtcc 6180  
cgccagcct gtgccctcag cctgtccct ccagcaggca ggcctgcaac tctcagagct 6240  
gcccacctgc atggagcgcc gggccctggg cagagtgtc acacacctgt gggaaggggt 6300  
ggaggaagcg ggcagtggcc tgaagagca ccaaccctc ggccagagcg cagctgtgc 6360  
ccgacgtgt ctgcacctcc gagcccaagc ccaggatgca tgaagcctgt ctgttcagc 6420  
gctgccacaa gcccaagaag ctgcagtggc tgggtgccgc ctggtcccag tgctctgtga 6480  
catgtgaaag aggaacacag aaaagattct taaaatgtgc tgaaaagtat gtttctggaa 6540  
agtatcgaga gctggcctca aagaagtgt cacatttgc gaagcccagc ctggagctgg 6600  
aacgtgcctg cgccccgtt ccatgcccc ggcaccccc atttctgtct gcgggacct 6660  
cgaggggcag ctggtttgcc tcacctggt ctcagtgcac ggccagctgt gggggaggcg 6720  
ttcagacgag gtccgtgcag tgccctggctg gggccggcc ggcctcagc tgccctctgc 6780  
accagaagcc ttggccctcc ctggcctgca acactcactt ctgccccatt gcagagaaga 6840

aagatgcctt ctgcaaagac tacttccact ggtgctacct ggtaccccag cacgggatgt 6900  
gcagccacaa gttctacggc aagcagtgt gcaagacttg ctctaagtcc aacttgaagc 6960  
ttgaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgacat catcatcatc 7020  
atcattgaga gcttgctgag aagtactaga ggatcataat cagccatacc acattttag 7080  
aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctcccct gaacctgaaa cataaaatga 7140  
atgcaattgt tgttgtaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 7200  
gcatcacaaa ttccacaaat aaagcatttt ttccactgca ttctagttgt ggtttgtcca 7260  
aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tctgatcact gcttgagcct aggagatccg 7320  
aaccagataa gtgaaatcta gttccaaact attttgtcat ttttaatttt cgtattagct 7380  
tacgacgcta caccagttc ccatctattt tgtcactctt ccctaaataa tccttaaaaa 7440  
ctccatttcc accctccca gttcccaact attttgtccg cccacagcgg ggcatttttc 7500  
ttcctgttat gttttaatc aaacatcctg ccaactccat gtgacaaacc gtcattctcg 7560  
gtacttttt ctctgtcaca gaatgaaaat ttttctgtca tctcttcgtt attaatgttt 7620  
gtaattgact gaatatcaac gcttatttgc agcctgaatg gcgaatgg 7668

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

P P01/08913

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/57, 9/64, 5/00, 1/19, 1/21, 1/15, C07K16/40, C12Q1/68, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ

PIR/SWISSPROT/GENESEQ

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/53774 A2 (NEUROCRINE BIOSCIENCES INC.), 14 September, 2000 (14.09.00), & AU 200036226 A	1-15, 18, 20-23
A	ROBKER R.L. et al., Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. Proc Natl Acad Sci U S A., 25 April, 2000, 97(9), pp.4689-94	1-15, 18, 20-23
A	TANG B.L., et al., ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats. FEBS Lett., 26 February, 1999, 445(2-3), pp.223-5	1-15, 18, 20-23
A	VAZQUEZ F. et al., METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. J Biol Chem., 13 August, 1999, 274(33), pp.23349-57	1-15, 18, 20-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing

date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other

special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other

means

"P" document published prior to the international filing date but later

than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to

understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered novel or cannot be considered to involve an inventive

step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered to involve an inventive step when the document is

combined with one or more other such documents, such

combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December, 2001 (20.12.01)

Date of mailing of the international search report

15 January, 2002 (15.01.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08913

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 19,24  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The above claims involve to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(I) of the PCT and Rule 39.1(IV) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: 16,17  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the compound or its salt as set forth in the above claims, no particular compound is disclosed by Examples, etc. in the description. Also, it is not stated what compounds are involved in the in the scope thereof. Thus, it is completely unknown what particular compounds are involved therein. Such being the case, the inventions as set forth in the above claims are not clear to such an extent as enabling meaningful international search.

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/08913

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/57, 9/64, 5/00, 1/19, 1/21, 1/15, C07K16/40, C12Q1/68, G01N33/50		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/00-15/90		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ PIR/SWISSPROT/GENESEQ BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/53774 A2 (NEUROCRINE BIOSCIENCES INC.) 14. 9月. 2000 (14. 09. 00) &AU 200036226 A	1-15, 18, 20-23
A	ROBKER R. L. et al., Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. Proc Natl Acad Sci U S A., 2000 Apr. 25, 97 (9), p. 4689-94	1-15, 18, 20-23
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	20. 12. 01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明
		4 B 9838 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TANG B.L., et al., ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats. FEBS Lett., 1999 Feb. 26, 445(2-3), p. 223-5	1-15, 18, 20-23
A	VAZQUEZ F. et al., METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. J Biol Chem., 1999 Aug. 13, 274(33), p. 23349-57	1-15, 18, 20-23

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 19, 24 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

上記請求の範囲は、人の診断方法を包含するものであるから、PCT17条(2)(a)(I)及びPCT規則39.1(IV)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2. ☒ 請求の範囲 16, 17 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

上記請求の範囲の化合物又はその塩については明細書中に実施例等をもって何ら具体的な化合物が開示されておらず、また、どのような化合物が包含されるかに関する他の記載もない。したがって、実際にどのような化合物が包含されるかは全く不明であり、上記請求の範囲に記載された発明は有意義な国際調査をすることができる程度まで明確でない。

3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。